

**PROCESS FOR PRODUCTION OF OPTICALLY ACTIVE 3-HYDROXY-PENTANENITRILE**

Patent Number: ☐ EP1452603  
Publication date: 2004-09-01  
Inventor(s): KAWANO SHIGERU [JP]; YASOHARA YOSHIHIKO [JP]  
Applicant(s): KANEGAFUCHI CHEMICAL IND [JP]  
Requested Patent: ☐ WO03031636  
Application Number: EP20020800753 20021003  
Priority Number(s): WO2002JP10312 20021003; JP20010309682 20011005  
IPC Classification: C12P13/00  
EC Classification: C12P13/00  
Equivalents: ☐ US2004235124  
Cited Documents:

---

**Abstract**

---

The present invention provides a method for preparing optically active 3-hydroxypentanenitrile with high yield. Optically active 3-hydroxypentanenitrile is prepared by stereoselectively reducing 3-ketopentanenitrile by action of an enzyme, which asymmetrically reduces 3-ketopentanenitrile to optically active 3-hydroxypentanenitrile. Also, alkali metal salt of 3-ketopentanenitrile, which is a stable compound without problems regarding storage, can be efficiently obtained.

---

Data supplied from the esp@cenet database -I2

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 4 月 17 日 (17.04.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/031636 A1

- (51) 国際特許分類: C12P 13/00 // (C12P 13/00, C12R 1:01) (C12P 13/00, C12R 1:025) (C12P 13/00, C12R 1:05) (C12P 13/00, C12R 1:06) (C12P 13/00, C12R 1:15) (C12P 13/00, C12R 1:32) (C12P 13/00, C12R 1:465) (C12P 13/00, C12R 1:645) (C12P 13/00, C12R 1:65) (C12P 13/00, C12R 1:66) (C12P 13/00, C12R 1:72) (C12P 13/00, C12R 1:77) (C12P 13/00, C12R 1:785) (C12P 13/00, C12R 1:80) (C12P 13/00, C12R 1:84) (C12P 13/00, C12R 1:845)
- (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 川野 茂 (KAWANO, Shigeru) [JP/JP]; 〒676-8688 兵庫県 高砂市 高砂町宮前町 1-8 鐘淵化学工業株式会社高砂工業所内 Hyogo (JP). 八十原 良彦 (YASOHARA, Yoshihiko) [JP/JP]; 〒676-8688 兵庫県 高砂市 高砂町宮前町 1-8 鐘淵化学工業株式会社高砂工業所内 Hyogo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/10312
- (74) 代理人: 朝日奈 宗太, 外 (ASAHINA, Sohta et al.); 〒540-0012 大阪府 大阪市中央区 谷町二丁目 2 番 2 2 号 N S ビル Osaka (JP).
- (22) 国際出願日: 2002 年 10 月 3 日 (03.10.2002)
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2001-309682 2001 年 10 月 5 日 (05.10.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 鐘淵化学工業株式会社 (KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒530-8288 大阪府 大阪市北区 中之島三丁目 2 番 4 号 Osaka (JP).
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,

[続葉有]

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCTION OF OPTICALLY ACTIVE 3-HYDROXY- PENTANENITRILE

(54) 発明の名称: 光学活性 3-ヒドロキシペンタンニトリルの製造方法

(57) Abstract: A process for producing optically active 3-hydroxy- pentanenitrile in a high yield by reducing 3-ketopentanenitrile stereoselectively by the use of an enzyme capable of reducing 3-ketopentanenitrile asymmetrically into optically active 3-hydroxypentanenitrile. 3-Ketopentanenitrile alkali metal salts can be also obtained efficiently, which are stable compounds unproblematic in respect of storage.

(57) 要約:

光学活性 3-ヒドロキシペンタンニトリルを高収率で製造する方法を提供する。3-ケトペンタンニトリルを光学活性 3-ヒドロキシペンタンニトリルに不斉還元する酵素を作用させて、3-ケトペンタンニトリルを立体選択的に還元して光学活性 3-ヒドロキシペンタンニトリルを製造する。また、保存の面でも問題がなく、安定な化合物である 3-ケトペンタンニトリル・アルカリ金属塩を効率的に取得することができる。

WO 03/031636 A1

WO 03/031636 A1



GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特  
許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,  
NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

## 明 細 書

### 光学活性 3-ヒドロキシペンタンニトリルの製造方法

#### 技術分野

本発明は、光学活性 3-ヒドロキシペンタンニトリルの製造法に関する。光学活性 3-ヒドロキシペンタンニトリルは、光学活性を必要とする医薬品、農薬などの合成原料および中間体として有用な化合物である。

#### 背景技術

光学活性 3-ヒドロキシペンタンニトリルの製造方法としては、ラセミ体の 3-アセトキシニトリル化合物を、チオクラウンエーテル存在下でシュードモナス・セパシア (*Pseudomonas cepacia*) 由来のリパーゼを用いて加水分解することによる光学分割法 (J. Org. Chem., 62, 9165 (1997)) が知られている。しかし、この方法は光学分割であるため、一方の立体の収率は最高でも 50% と低く、満足いくものではない。また、生成する 3-ヒドロキシペンタンニトリルの光学純度も低く、かつ酵素の識別能を上げるためにチオクラウンエーテルを添加しているので、コスト面・安全面を考えると工業的实施は困難である。

また、本発明における光学活性 3-ヒドロキシペンタンニトリルの製造のための原料として使用する 3-ケトペンタンニトリルの合成法は既に報告されている (WO 94/21617) が、得られる 3-ケトペンタンニトリル自体が不安定な化合物であり、自然にポリマー化することが既に報告されている (Aust. J. Chem., 44, 1263, (1991))。このことから、3-ケトペンタンニトリルを長期間保存するのは

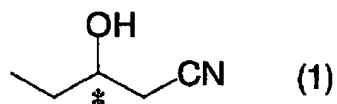
困難であり、工業的観点から見ると使用が困難である。

本発明者らは、光学活性 3-ヒドロキシペンタンニトリルの効率的な製造法を開発すべく検討を重ねた結果、3-ケトペンタンニトリルを立体選択的に還元し、光学活性 3-ヒドロキシペンタンニトリルに変換する能力を有する酵素源を新たに発見し、本発明を完成するに至った。

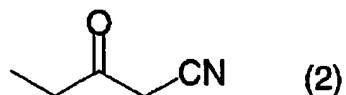
さらに、3-ケトペンタンニトリルの不安定さによる保存性などの問題点を回避するために、そのアルカリ金属塩について着目して検討を重ねた結果、保存の面でも問題がなく、安定な化合物である 3-ケトペンタンニトリル・アルカリ金属塩を効率的に取得できる方法を発見し、本発明を完成するに至った。

#### 発明の開示

すなわち、本発明は、下記式 (1) :



で表される光学活性 3-ヒドロキシペンタンニトリルの製造方法であって、下記式 (2) :



で表される 3-ケトペンタンニトリルに、3-ケトペンタンニトリルを光学活性 3-ヒドロキシペンタンニトリルに不斉還元する酵素を作用させることにより、光学活性 3-ヒドロキシペンタンニトリルとする製造方法に関する。

酵素が、アースロアスカス (Arthroascus) 属、キャンディ

ダ (Candida) 属、クリプトコッカス (Cryptococcus) 属、デバリオマイセス (Debaryomyces) 属、デッケラ (Dekkera) 属、ディポダスカス (Dipodascus) 属、ゲオトリカム (Geotrichum) 属、ギラモンデラ (Guilliermondella) 属、ハイホピキア (Hyphopichia) 属、イサチェンキア (Issatchenkia) 属、クルイペロマイセス (Kluyveromyces) 属、コマガテラ (Komagataella) 属、リポマイセス (Lipomyces) 属、ロダロマイセス (Lodderomyces) 属、メシュニコワ (Metschnikowia) 属、オガタエア (Ogataea) 属、ピキア (Pichia) 属、ロドトルーラ (Rhodotorula) 属、ロドスポリディウム (Rhodosporidium) 属、シゾプラストスポリオン (Schizoblastosporion) 属、シュワニオマイセス (Schwannomyces) 属、ステファノアスカス (Stephanoascus) 属、トルラスボラ (Torulaspora) 属、トリコスポロン (Trichosporon) 属、ウィロプシス (Williopsis) 属、ヤロア (Yarrowia) 属、アシディフィラム (Acidophilium) 属、アグロバクテリアム (Agrobacterium) 属、アルカリゲネス (Alcaligenes) 属、アースロバクター (Arthrobacter) 属、ブレブンディモナス (Brevundimonas) 属、セルロモナス (Cellulomonas) 属、コマモナス (Comamonas) 属、ミクロバクテリアム (Microbacterium) 属、パエニバシラス (Paenibacillus) 属、ロドコッカス (Rhodococcus) 属、シテロマイセス (Citeromyces) 属、アクロモバクター (Achromobacter) 属、コリネバクテリアム (Corynebacterium) 属、デボシア

(Devosia) 属、ホフニア (Hofnia) 属、プロテウス (Proteus) 属、プロビデンシア (Providencia) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、アブシディア (Absidia) 属、アエゲリタ (Aegerita) 属、アグロシベ (Agrocybe) 属、アミロステレウム (Amylostereum) 属、アスペルギルス (Aspergillus) 属、コリナスカス (Corynascus) 属、デンドリフィエラ (Dendryphiella) 属、エメリセラ (Emericella) 属、フサリウム (Fusarium) 属、ギベレラ (Gibberella) 属、グロメレラ (Glomerella) 属、マクロフォーマ (Macrophoma) 属、ミクロネクトリエラ (Micronectriella) 属、モルチエレラ (Mortierella) 属、ムコール (Mucor) 属、ナンニジア (Nannizzia) 属、ペニシリウム (Penicillium) 属、フィアロフォラ (Phialophora) 属、リゾプス (Rhizopus) 属、スクレロチニア (Sclerotinia) 属、スクレロチウム (Sclerotium) 属、およびストレプトマイセス (Streptomyces) 属からなる群より選ばれる微生物の、菌体、培養液、それらの処理物中に存在する酵素、および／またはこれらの微生物から得られる精製酵素であることが好ましい。

生成物である光学活性 3-ヒドロキシペンタンニトリルの絶対配置が R 体であり、酵素が、アースロアスカス (Arthroascus) 属、キャンディダ (Candida) 属、クリプトコッカス (Cryptococcus) 属、デバリオマイセス (Debaryomyces) 属、デッケラ (Dekkera) 属、ゲオトリカム (Geotrichum) 属、ギラモンデラ (Guilliermondella) 属、イサチエンキア (Issatchenkia) 属、クルイペロマイセス (Kluyv

eromyces) 属、コマガテラ (Komagataella) 属、リ  
ボマイセス (Lipomyces) 属、ロダロマイセス (Loddero  
myces) 属、メシュニコワ (Metschnikowia) 属、オガ  
タエア (Ogataea) 属、ピキア (Pichia) 属、ロドトルーラ  
(Rhodotorula) 属、ロドスポリディウム (Rhodspor  
idium) 属、シュワニオマイセス (Schwanniomyces)  
属、ステファノアスカス (Stephanoascus) 属、トルラスポ  
ラ (Torulaspora) 属、トリコスボロン (Trichospor  
on) 属、ウィロプシス (Williopsis) 属、ヤロア (Yar  
rowia) 属、アシディフィラム (Acidephili  
um) 属、ア  
グロバクテリウム (Agrobacterium) 属、アルカリゲネス  
(Alcaligenes) 属、アースロバクター (Arthrobac  
ter) 属、セルロモナス (Cellulomonas) 属、コマモナス  
(Comamonas) 属、ミクロバクテリウム (Microbacte  
rium) 属、ロドコッカス (Rhodococcus) 属、シテロマイ  
セス (Citeromyces) 属、アクロモバクター (Achromo  
bacter) 属、コリネバクテリウム (Corynebacteriu  
m) 属、デボシア (Devosia) 属、ホフニア (Hofnia) 属、  
プロテウス (Proteus) 属、プロビデンシア (Providenc  
ia) 属、アブシディア (Absidia) 属、アエゲリタ (Aeger  
ita) 属、アグロシベ (Agrocybe) 属、アミロステレウム (A  
mylostereum) 属、アスパラギルス (Aspergillu  
s) 属、コリナスカス (Corynascucs) 属、デンドリフィエラ  
(Dendryphiella) 属、エメリセラ (Emericell  
a) 属、フサリウム (Fusarium) 属、ギベレラ (Gibbere  
lla) 属、グロメレラ (Glomerella) 属、マクロフォーマ



(Macrophoma) 属、ミクロネクトリエラ (Micronectriella) 属、モルチエレラ (Mortierella) 属、ムコール (Mucor) 属、ナンニジア (Nannizzia) 属、ペニシリウム (Penicillium) 属、フィアロフォラ (Phialophora) 属、リゾプス (Rhizopus) 属、スクレロチニア (Sclerotinia) 属、スクレロチウム (Sclerotium) 属、およびストレプトマイセス (Streptomyces) 属からなる群より選ばれる微生物の、菌体、培養液、それらの処理物中に存在する酵素、および/またはこれらの微生物から得られる精製酵素であることが好ましい。

生成物である光学活性3-ヒドロキシペンタンニトリルの絶対配置がR体であり、酵素が、アースロアスカス・ジャバネンシス (Arthroascus javanensis)、キャンディダ・カンタレリ (Candida cantarelli)、キャンディダ・フェンニカ (Candida fennica)、キャンディダ・グラブラータ (Candida glabrata)、キャンディダ・グロッペンギッセリ (Candida gropengiesseri)、キャンディダ・ケフィア (Candida kefir)、キャンディダ・マリス (Candida maris)、キャンディダ・メリニ (Candida meli)、キャンディダ・ムサエ (Candida musae)、キャンディダ・パラルゴーサ (Candida pararugosa)、キャンディダ・ピヌス (Candida pinus)、キャンディダ・ソルボフィラ (Candida sorbophila)、キャンディダ・テヌイス (Candida tenuis)、キャンディダ・ユティリス (Candida utilis)、クリプトコッカス・キューバタス (Cryptococcus curvatus)、クリプトコッカス・フュミコラス (Cryptococcus humicolus)、デバリ

オマイセス・ハンセニイ (Debaryomyces hansenii)、デバリオマイセス・ハンセニイ・パー・ファブリー (Debaryomyces hansenii var. fabryi)、デバリオマイセス・ハンセニイ・パー・ハンセニイ (Debaryomyces hansenii var. hansenii)、デバリオマイセス・マラム (Debaryomyces marama)、デバリオマイセス・ネパレンシス (Debaryomyces nepalensis)、デッケラ・アノマラ (Dekkera anomala)、ゲオトリカム・キャンディダム (Geotrichum candidum)、ゲオトリカム・エリエンセ (Geotrichum eriense)、ゲオトリカム・ファーメンタス (Geotrichum fermentans)、ギラモンデラ・セレノスポラ (Guilliermondella selenospora)、イサチエンキア・オリエンタリス (Issatchenkia orientalis)、イサチエンキア・テリコラ (Issatchenkia terricola)、クルイベロマイセス・マキシアヌス (Kluyveromyces marxianus)、コマガテラ・パストリス (Komagataella pastoris)、リボマイセス・スターケイ (Lipomyces starkeyi)、ロダロマイセス・エロンギスポラス (Lodderomyces elongisporus)、メシュニコワ・ピカスピダータ (Metschnikowia bicuspidata)、メシュニコワ・グルエシー (Metschnikowia gruessii)、オガタエア・ピニ (Ogataea pini)、オガタエア・ウィッカーハミー (Ogataea wickerhamii)、ピキア・アノマラ (Pichia anomala)、ピキア・カナデンシス (Pichia canadensis)、ピキア・ジャディニー (Pichia jadin

ii)、ピキア・ペタソニー (Pichia petersonii)、  
ピキア・ロダネンシス (Pichia rhodanensis)、ピキ  
ア・シルビコラ (Pichia silvicola)、ピキア・トリア  
ングラリス (Pichia triangularis)、ロードトル  
ーラ・ラクトーサ (Rhodotorula lactosa)、ロードトル  
ーラ・ルブラ (Rhodotorula rubra)、ロドスポリディ  
ウム・ディオボバタム (Rhodsporidium diobovat  
um)、ロドスポリディウム・スファエロカープム (Rhodspori  
dium sphaerocarpum)、ロドスポリディウム・トルロ  
イデス (Rhodsporidium toruloides)、シュワ  
ニオマイセス・オシデンタリス・バー・オシデンタリス (Schwann  
iomyces occidentalis var. occiden  
talis)、ステファノアスカス・シフェリー (Stephanoas  
cus ciferrii)、トルラスボラ・デルブルエッキー (Tor  
ulaspora delbrueckii)、トリコスポロン・キュタ  
ネウム (Trichosporon cutaneum)、ウイロプシス  
・サターナス・バー・ムラッキ (Williopsis saturnu  
s var. mrakii)、ウイロプシス・サターナス・バー・サタ  
ーナス (Williopsis saturnus var. satu  
rnus)、ウイロプシス・サターナス・バー・シュアベリレンス (W  
illiopsis saturnus var. suaveolen  
s)、ヤロア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica)  
)、アシディフィラム・クリプタム (Acidephillum cry  
ptum)、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (Agrobact  
erium tumefaciens)、アルカリゲネス・エスピー (Alcaligenes sp.)、アクロモバクター・キシロソキシダ

ンス・サブスピー・デニトリフィカンス (Achromobacter xylosoxidans subsp. denitrificans)、アースロバクター・プロトフォーミ (Arthrobacter protophormiae)、セルロモナス・ゲリダ (Cellulomonas gelida)、コマモナス・テストステロニ (Comamonas testosteroni)、ミクロバクテリウム・アーボレスセンス (Microbacterium arborescens)、ロドコッカス・イクイ (Rhodococcus equi)、ロドコッカス・エリイスロポリス (Rhodococcus erythropolis)、ロドコッカス・ロドクロウス (Rhodococcus rhodochrous)、キャンディダ・マグノリエ (Candida magnoliae)、シテロマイセス・マトリテンシス (Citeromyces matritensis)、ピキア・ビスポーラ (Pichia bispora)、トリコスポロン・ロウビエリ・バー・ロウビエリ (Trichosporon loubieri var. loubieri)、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス (Corynebacterium ammoniagenes)、コリネバクテリウム・フラベセンス (Corynebacterium flavescens)、デボシア・リボフラビナ (Devosia riboflavina)、ホフニア・アルペイ (Hofnia alvei)、プロテウス・ブルガリス (Proteus vulgaris)、プロビデンシア・アルカリファシエンス (Providencia alcalifaciens)、アブシディア・コエルレア (Absidia coerulea)、アブシディア・ヒアロスボラ (Absidia hyalospora)、アエゲリタ・キャンディダ (Aegerita candida)、アグロシベ・シリンドラッシ (Agrocybe cylindracea)、

アミロステレウム・アエロラタム (Amylostereum areolatum)、アスパラギルス・ニガー (Aspergillus niger)、アスパラギルス・フォエニシス (Aspergillus phoenicis)、アスパラギルス・ソジャエ (Aspergillus sojae)、コリナスカス・セペドニウム (Corynascus sepedonium)、デンドリフィエラ・サリナ (Dendryphiella salina)、エメリセラ・ニーデュランズ・バー・ニーデュランズ (Emericella nidulans var. nidulans)、エメリセラ・ウングイス (Emericella unguis)、フサリウム・オキシスポラム (Fusarium oxysporum)、フサリウム・アングイオイデス (Fusarium anguioides)、ギベレラ・フジクロイ (Gibberella fujikuroi)、グロメレラ・シングラータ (Glomerella cingulata)、マクロフォーマ・コンメリナエ (Macrophoma commelinae)、ミクロネクトリエラ・ククメリス (Micronectriella cucumeris)、モルチエレラ・イサベリーナ (Mortierella isabellina)、モルチエレラ・ラマンニアナ・バー・アングリスポラ (Mortierella ramanniana var. angulisporea)、ムコール・チューバーキュリスポラス (Mucor tuberculisporus)、ムコール・イナエキュイスポラス (Mucor inaequisporus)、ナンニジア・ギプシア・バー・インキュバータ (Nannizzia gypsea var. incurvata)、ペニシリウム・キアメシウム (Penicillium chermesium)、ペニシリウム・エクスパンサム (Penicillium expansum)、フィアロフォラ・ファスティギアナ (Phialoph

ora fastigiata)、リゾプス・ニヴェウス (Rhizopus niveus)、リゾプス・オライゼ (Rhizopus oryzae)、スクレロチニア・スクレロチオラム (Sclerotinia sclerotiorum)、スクレロチウム・デルフィニイ (Sclerotium delphinii)、ストレプトマイセス・カカオイ・サブスピー・アソエンシス (Streptomyces cacaoi subsp. asoensis)、およびストレプトマイセス・エスピー (Streptomyces sp.) からなる群より選ばれる微生物の、菌体、培養液、それらの処理物中に存在する酵素、および／またはこれらの微生物から得られる精製酵素であることが好ましい。

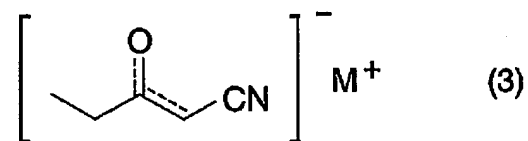
生成物である光学活性 3-ヒドロキシペンタンニトリルの絶対配置が S 体であり、酵素が、キャンディダ (Candida) 属、ディポダスカス (Dipodascus) 属、ゲオトリカム (Geotrichum) 属、ハイポピキア (Hyphopichia) 属、クルイペロマイセス (Kluyveromyces) 属、ピキア (Pichia) 属、シゾブラストスポリオン (Schizoblastosporion) 属、シュワニオマイセス (Schwanniomyces) 属、ブレブンディモナス (Brevundimonas) 属、パエニバシラス (Paenibacillus) 属、ロードトルーラ (Rhodotorula) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、およびストレプトマイセス (Streptomyces) 属からなる群より選ばれる微生物の、菌体、培養液、それらの処理物中に存在する酵素、および／またはこれらの微生物から得られる精製酵素であることが好ましい。

生成物である光学活性 3-ヒドロキシペンタンニトリルの絶対配置が S 体であり、酵素が、キャンディダ・アルビカンス (Candida albicans)、キャンディダ・ハエムロニー (Candida haemulonii)、

mulonii)、キャンディダ・インターメディア (Candida intermedia)、キャンディダ・マルトーサ (Candida maltosa)、キャンディダ・モギイ (Candida mogii)、キャンディダ・オレオフィラ (Candida oleophila)、ディポダスカス・オベテンシス (Dipodascus ovete nsis)、ディポダスカス・テトラスパーマ (Dipodascus tetrasperma)、ゲオトリカム・フラグランス (Geotri chum fragrans)、ハイポピキア・バートニイ (Hypop ichia burtonii)、クルイベロマイセス・ポリスポラス (Kluyveromyces polysporus)、ピキア・ステイ ピティス (Pichia stipitis)、シゾブラストスポリオン ・コバヤシー (Schizoblastosporion kobaya sii)、シュワニオマイセス・オシデンタリス・バー・オシデンタリス (Schwanniomyces occidentalis var. occidentalis)、ブレブンディモナス・ディミニュータ (B revundimonas diminuta)、パエニバシラス・アル ベイ (Paenibacillus alvei)、ロードトルーラ・グ ルチニス・ヴァー・ダイレネンシス (Rhodotorula glut inis var. daiarenensis)、シュードモナス・スタッ ツゼリ (Pseudomonas stutzeri)、シュードモナス ・メンドシナ (Pseudomonas mendocina)、ストレ プトマイセス・コエレスセンス (Streptomyces coele scens)、およびストレプトマイセス・ハイドロゲナンス (Stre ptomyces hydrogenans) からなる群より選ばれる微 生物の、菌体、培養液、それらの処理物中に存在する酵素、および／またはこれらの微生物から得られる精製酵素であることが好ましい。

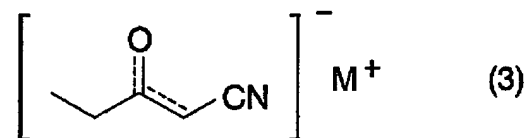
酸化型ニコチンアミド・アデニンジヌクレオチド (NAD<sup>+</sup>)、酸化型ニコチンアミド・アデニンジヌクレオチドリリン酸 (NADP<sup>+</sup>) のいずれかまたは両方を、それぞれの還元型へ還元する酵素および還元するための基質と共存させることが好ましい。

また 3-ケトペンタンニトリルとして、下記一般式 (3) :



(式中、Mはアルカリ金属を表す) で表される 3-ケトペンタンニトリルアルカリ金属塩を使用することが好ましい。

また本発明は、アルカリ金属塩基の存在下で、プロピオン酸エステルとアセトニトリルより 3-ケトペンタンニトリルを合成し、この反応系中から 3-ケトペンタンニトリルを下記一般式 (3) :



(式中、Mはアルカリ金属を表す) で表されるアルカリ金属塩として取得する 3-ケトペンタンニトリルアルカリ金属塩の製造方法に関する。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明について詳述する。

本発明の基質として用いられる 3-ケトペンタンニトリルは、WO 94/21617 に記載された方法により合成可能である。

本発明で使用する酵素は、3-ケトペンタンニトリルを光学活性な 3-ヒドロキシペンタンニトリルに変換する酵素である。具体的には、カルボ



ニル基を水酸基に還元するレダクターゼ、デヒドロゲナーゼなどがあげられる。これらの酵素は、菌体、培養液、あるいは菌体処理物中に存在するか、または精製されており、本発明において、これらを単独で用いても、2種以上組み合わせて用いてもよい。

3-ケトペンタンニトリルを光学活性な3-ヒドロキシペンタンニトリルに変換する能力を有する微生物は、例えば、以下に説明する方法によって見いだすことができる。例えば、グルコース40g、酵母エキス3g、リン酸水素二アンモニウム6.5g、リン酸二水素カリウム1g、硫酸マグネシウム7水和物0.8g、硫酸亜鉛7水和物60mg、硫酸鉄7水和物90mg、硫酸銅5水和物5mg、硫酸マンガン4水和物10mg、塩化ナトリウム100mg（いずれも1L当たり）からなる液体培地（pH7）5mlを試験管に入れて滅菌した後、無菌的に微生物を接種し、30℃で2～3日間振とう培養する。その後、菌体を遠心分離により集め、グルコース2～10%を含んだリン酸緩衝液1～5mlに懸濁する。そして、あらかじめ3-ケトペンタンニトリルを2.5～25mg入れた試験管に懸濁液を加えて、2～3日間30℃で振とうする。この際、遠心分離により得た菌体をデシケーター中またはアセトンにより乾燥したものをしていることもできる。

本発明に使用する微生物としては、3-ケトペンタンニトリルを光学活性3-ヒドロキシペンタンニトリルに変換する能力を有する微生物であればいずれも使用し得る。例えば、アースロアスカス (Arthroascus) 属、キャンディダ (Candida) 属、クリプトコッカス (Cryptococcus) 属、デバリオマイセス (Debaryomyces) 属、デッケラ (Dekkera) 属、ディポダスカス (Dipodascus) 属、ゲオトリカム (Geotrichum) 属、ギラモンデラ (Guilliermondella) 属、ハイホピキア (Hyphop

ichia) 属、イサチェンキア (Issatchenkia) 属、クル  
イベロマイセス (Kluyveromyces) 属、コマガテラ (Kom  
agataella) 属、リボマイセス (Lipomyces) 属、ロダ  
ロマイセス (Lodderomyces) 属、メシュニコワ (Metsc  
hnikowia) 属、オガタエア (Ogataea) 属、ピキア (Pi  
chia) 属、ロドトルーラ (Rhodotorula) 属、ロドスポリ  
ディウム (Rhodsporidium) 属、シゾブラストスポリオン  
(Schizoblastosporion) 属、シュワニオマイセス  
(Schwanniomyces) 属、ステファノアスカス (Steph  
anoascus) 属、トルラスポラ (Torulaspora) 属、ト  
リコスポロン (Trichosporon) 属、ウイロプシス (Will  
iopsis) 属、ヤロア (Yarrowia) 属、アシディフィラム  
(Acidephilium) 属、アグロバクテリウム (Agrobac  
terium) 属、アルカリゲネス (Alcaligenes) 属、アー  
スロバクター (Arthrobacter) 属、ブレブンディモナス (B  
revundimonas) 属、セルロモナス (Cellulomona  
s) 属、コマモナス (Comamonas) 属、ミクロバクテリウム (M  
icrobacterium) 属、パエニバシラス (Paenibaci  
llus) 属、ロドコッカス (Rhodococcus) 属、シテロマイ  
セス (Citeromyces) 属、アクロモバクター (Achromo  
bacter) 属、コリネバクテリウム (Corynebacteriu  
m) 属、デボシア (Devosia) 属、ホフニア (Hofnia) 属、  
プロテウス (Proteus) 属、プロビデンシア (Providenc  
ia) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、アブシディア  
(Absidia) 属、アエグリタ (Aegerita) 属、アグロシベ  
(Agrocybe) 属、アミロステレウム (Amylostereu

m) 属、アスバラギルス (Aspergillus) 属、コリナスカス (Corynascus) 属、デンドリフィエラ (Dendryphella) 属、エメリセラ (Emericella) 属、フサリウム (Fusarium) 属、ギベレラ (Gibberella) 属、グロメレラ (Glomerella) 属、マクロフォーマ (Macrophoma) 属、ミクロネクトリエラ (Micronectriella) 属、モルチエラ (Mortierella) 属、ムコール (Mucor) 属、ナンニジア (Nannizzia) 属、ペニシリウム (Penicillium) 属、フィアロフォラ (Phialophora) 属、リゾプス (Rhizopus) 属、スクレロチニア (Sclerotinia) 属、スクレロチウム (Sclerotium) 属、およびストレプトマイセス (Streptomyces) 属に属する微生物があげられる。

特に、絶対配置がR体の3-ヒドロキシペンタンニトリルに変換する場合には、アースロアスカス (Arthroascus) 属、キャンディダ (Candida) 属、クリプトコッカス (Cryptococcus) 属、デバリオマイセス (Debaryomyces) 属、デッケラ (Dekkera) 属、ゲオトリカム (Geotrichum) 属、ギラモンデラ (Guilliermondella) 属、イサチエンキア (Issatchenkia) 属、クルイベロマイセス (Kluyveromyces) 属、コマガテラ (Komagataella) 属、リボマイセス (Lipomyces) 属、ロダロマイセス (Lodderomyces) 属、メシュニコワ (Metschnikowia) 属、オガタエア (Ogataea) 属、ピキア (Pichia) 属、ロドトルーラ (Rhodotorula) 属、ロドスポリディウム (Rhodsporidium) 属、シュワニオマイセス (Schwanniomyces) 属、ステファノアスカス (Stephanoascus) 属、トルラスボラ (Torul

aspora) 属、トリコスポロン (Trichosporon) 属、ウィロプシス (Williopsis) 属、ヤロア (Yarrowia) 属、アシディフィラム (Acidophilium) 属、アグロバクテリウム (Agrobacterium) 属、アルカリゲネス (Alcaligenes) 属、アースロバクター (Arthrobacter) 属、セルロモナス (Cellulomonas) 属、コマモナス (Comamonas) 属、ミクロバクテリウム (Microbacterium) 属、ロドコッカス (Rhodococcus) 属、シテロマイセス (Citeromyces) 属、アクロモバクター (Achromobacter) 属、コリネバクテリウム (Corynebacterium) 属、デボシア (Devosia) 属、ホフニア (Hofnia) 属、プロテウス (Proteus) 属、プロビデンシア (Providencia) 属、アブシディア (Absidia) 属、アエゲリタ (Aegerita) 属、アグロシベ (Agrocybe) 属、アミロステレウム (Amylostereum) 属、アスパラギルス (Aspergillus) 属、コリナスカス (Corynascus) 属、デンドリフィエラ (Dendryphiella) 属、エメリセラ (Emericella) 属、フサリウム (Fusarium) 属、ギベレラ (Gibberella) 属、グロメレラ (Glomerella) 属、マクロフォーマ (Macrophoma) 属、ミクロネクトリエラ (Micronectriella) 属、モルチエレラ (Mortierella) 属、ムコール (Mucor) 属、ナンニジア (Nannizzia) 属、ペニシリウム (Penicillium) 属、フィアロフォラ (Phialophora) 属、リゾプス (Rhizopus) 属、スクレロチニア (Sclerotinia) 属、スクレロチウム (Sclerotium) 属、およびストレプトマイセス (Streptomyces) 属に属する微生物が好ましい。さらに好まし

くは、アースロアスカス・ジャバネンシス (Arthroascus j  
avanensis)、キャンディダ・カンタレリ (Candida c  
antarellii)、キャンディダ・フェンニカ (Candida  
fennica)、キャンディダ・グラブラータ (Candida gl  
abrata)、キャンディダ・グロップエンギッセル (Candida  
gropengiesserii)、キャンディダ・ケフィア (Candi  
da kefyri)、キャンディダ・マリス (Candida mari  
s)、キャンディダ・メリニイ (Candida melinii)、キ  
ャンディダ・ムサエ (Candida musae)、キャンディダ・パ  
ラルゴーサ (Candida pararugosa)、キャンディダ・  
ピヌス (Candida pinus)、キャンディダ・ソルボフィラ (C  
andida sorbophila)、キャンディダ・テヌイス (C  
andida tenuis)、キャンディダ・ユティリス (Candi  
da utilis)、クリプトコッカス・キューバタス (Crypto  
coccus curvatus)、クリプトコッカス・フュミコラス (Cryptococcus  
humicola)、デバリオマイセス・  
ハンセニイ (Debaryomyces hansenii)、デバリオ  
マイセス・ハンセニイ・パー・ファブリー (Debaryomyces  
hansenii var. fabryi)、デバリオマイセス・ハン  
セニイ・パー・ハンセニイ (Debaryomyces hansenii  
i var. hansenii)、デバリオマイセス・マラマ (Deb  
aryomyces marama)、デバリオマイセス・ネパレンシス  
(Debaryomyces nepalensis)、デッケラ・アノ  
マラ (Dekkera anomala)、ゲオトリカム・キャンディダ  
ム (Geotrichum candidum)、ゲオトリカム・エリエ  
ンセ (Geotrichum eriensense)、ゲオトリカム・ファー

メンタス (Geotrichum fermentans)、ギラモンデ  
ラ・セレノスポラ (Guilliermondella selenos  
pora)、イサチェンキア・オリエンタリス (Issatchenki  
a orientalis)、イサチェンキア・テリコーラ (Issat  
chenkia terricola)、クルイベロマイセス・マキシア  
ヌス (Kluyveromyces marxianus)、コマガテラ  
・パストリス (Komagataella pastoris)、リボマ  
イセス・スターキー (Lipomyces starkeyi)、ロダ  
ロマイセス・エロンギスボラス (Lodderomyces elong  
isporus)、メシュニコワ・ピカスピダータ (Metschnik  
owia bicuspidata)、メシュニコワ・グルエシー (Me  
tschnikowia gruessii)、オガタエア・ピニ (Og  
ataea pini)、オガタエア・ウィッカーハミー (Ogatae  
a wickerhamii)、ピキア・アノマラ (Pichia an  
omala)、ピキア・カナデンシス (Pichia canadens  
is)、ピキア・ジャディニー (Pichia jadinii)、ピキ  
ア・ペタソニー (Pichia petersonii)、ピキア・ロダ  
ネンシス (Pichia rhodanensis)、ピキア・シルビコ  
ラ (Pichia silvicola)、ピキア・トリアングラリス (P  
ichia triangularis)、ロードトルーラ・ラクトー  
サ (Rhodotorula lactosa)、ロードトルーラ・ルブラ  
(Rhodotorula rubra)、ロドスポリディウム・ディオ  
ボバタム (Rhodsporidium diobovatum)、ロド  
スポリディウム・スファエロカープム (Rhodsporidium s  
phaerocarpum)、ロドスポリディウム・トルロイデス (Rh  
odsporidium toruloides)、シュワニオマイセス

・オシデンタリス・パー・オシデンタリス (Schwanniomyces occidentalis var. occidentalis)  
、ステファノアスカス・シフェリー (Stephanoascus ciferrii)、トルラスボラ・デルブルエッキー (Torulaspora delbrueckii)、トリコスポロン・キュタネウム (Trichosporon cutaneum)、ウイロプシス・サターナス  
・パー・ムラッキ (Williopsis saturnus var. mrakii)、ウイロプシス・サターナス・パー・サターナス (Williopsis saturnus var. saturnus)  
、ウイロプシス・サターナス・パー・シュアベリレンス (Williopsis saturnus var. suaveolens)、ヤロア  
・リポリティカ (Yarrowia lipolytica)、アシディ  
フィラム・クリプタム (Acidophilium cryptum)、  
アグロバクテリウム・ツメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens)、アルカリゲネス・エスピー (Alcaligenes sp. )、アクロモバクター・キシロソキシダンス・サブス  
ピー・デニトリフィカンス (Achromobacter xylosoxidans subsp. denitrificans)、アースロ  
バクター・プロトフォーミ (Arthrobacter protophormiae)、セルロモナス・ゲリダ (Cellulomonas gelida)、コマモナス・テストステロニ (Comamonas testosteroni)、ミクロバクテリウム・アーボレスセンス (Microbacterium arborescens)、ロドコッカス・  
イクイ (Rhodococcus equi)、ロドコッカス・エリイス  
ロポリス (Rhodococcus erythropolis)、ロド  
コッカス・ロドクロウス (Rhodococcus rhodochro

us)、キャンディダ・マグノリエ (Candida magnoliae)、シテロマイセス・マトリテンシス (Citeromyces matritensis)、ピキア・ビスポーラ (Pichia bispora)、トリコスボロン・ロウビエリ・バー・ロウビエリ (Trichosporon loubieri var. loubieri)、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス (Corynebacterium ammoniagenes)、コリネバクテリウム・フラベスセンス (Corynebacterium flavescens)、デボシア・リボフラビナ (Devosia riboflavina)、ホフニア・アルベイ (Hofnia alvei)、プロテウス・ブルガリス (Proteus vulgaris)、プロビデンシア・アルカリファシエンス (Providencia alcalifaciens)、アブシディア・コエルレア (Absidia coerulea)、アブシディア・ヒアロスポラ (Absidia hyalospora)、アエグリタ・キャンディダ (Aegerita candida)、アグロシベ・シリンドラッシ (Agrocybe cylindracea)、アミロステレウム・アエロラタム (Amylostereum areolatum)、アスパラギルス・ニガー (Aspergillus niger)、アスパラギルス・フォエニシス (Aspergillus phoenicis)、アスパラギルス・ソジャエ (Aspergillus sojae)、コリナスカス・セベドニウム (Corynascucs sepedonium)、デンドリフィエラ・サリナ (Dendryphiella salina)、エメリセラ・ニーデュランズ・バー・ニーデュランズ (Emericella nidulans var. nidulans)、エメリセラ・ウングイス (Emericella unguis)、フサリウム・オキシスポラム (Fusarium oxysporum)



)、フサリウム・アングイオイデス (Fusarium anguioides)、ギベレラ・フジクロイ (Gibberella fujikuroi)、グロメレラ・シングラータ (Glomerella cingulata)、マクロフォーマ・コンメリナエ (Macrophoma commelinae)、ミクロネクトリエラ・ククメリス (Micronectriella cucumeris)、モルチエレラ・イサベリーナ (Mortierella isabellina)、モルチエレラ・ラマンニアナ・バー・アングリスポラ (Mortierella rammanniana var. angulispora)、ムコール・チューバーキュリスポラス (Mucor tuberculisporus)、ムコール・イナエキューリスポラス (Mucor inaequisporus)、ナンニジア・ギプシア・バー・インキュパータ (Nannizzia gypsea var. incurvata)、ペニシリウム・キアメシウム (Penicillium chermesium)、ペニシリウム・エクスパンサム (Penicillium expansum)、フィアロフォラ・ファスティギアナ (Phialophora fastigiata)、リゾプス・ニヴェウス (Rhizopus niveus)、リゾプス・オライゼ (Rhizopus oryzae)、スクレロチニア・スクレロチオラム (Sclerotinia sclerotiorum)、スクレロチウム・デルフィニイ (Sclerotium delphinii)、ストレプトマイセス・カカオイ・サブスピー・アソエンシス (Streptomyces cacaoi subsp. asoensis)、およびストレプトマイセス・エスピー (Streptomyces sp.) があげられる。

また、絶対配置がS体の3-ヒドロキシペンタンニトリルに変換する場合には、キャンディダ (Candida) 属、ディボダスカス (Dipo

dascus) 属、ゲオトリカム (Geotrichum) 属、ハイボピキア (Hypophichia) 属、クルイベロマイセス (Kluyveromyces) 属、ピキア (Pichia) 属、シゾブラストスポリオン (Schizoblastosporion) 属、シュワニオマイセス (Schwanniomyces) 属、ブレブンディモナス (Brevundimonas) 属、パエニバシラス (Paenibacillus) 属、ロードトルーラ (Rhodotorula) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、およびストレプトマイセス (Streptomyces) 属に属する微生物が好ましい。さらに好ましくは、キャンディダ・アルビカンス (Candida albicans)、キャンディダ・ハエムロニー (Candida haemulonii)、キャンディダ・インターメディア (Candida intermedia)、キャンディダ・マルトーサ (Candida maltosa)、キャンディダ・モギイ (Candida mogii)、キャンディダ・オレオフィラ (Candida oleophila)、ディポダスカス・オベテンシス (Dipodascus ovetensis)、ディポダスカス・テトラスパーマ (Dipodascus tetrasperma)、ゲオトリカム・フラグラン (Geotrichum fragrans)、ハイボピキア・バートニイ (Hypophichia burtonii)、クルイベロマイセス・ポリスポラス (Kluyveromyces polysporus)、ピキア・スティピティス (Pichia stipitis)、シゾブラストスポリオン・コバヤシー (Schizoblastosporion kobayashii)、シュワニオマイセス・オシデンタリス・バー・オシデンタリス (Schwanniomyces occidentalis var. occidentalis)、ブレブンディモナス・ディミヌータ (Brevundimonas

diminuta)、パエニバシラス・アルベイ (Paenibacillus alvei)、ロードトルーラ・グルチニス・ヴァー・ダイレネンシス (Rhodotorula glutinis var. dairiensis)、シュードモナス・スタッツゼリ (Pseudomonas stutzeri)、シュードモナス・メンドシナ (Pseudomonas mendocina)、ストレプトマイセス・コエレスセンス (Streptomyces coelestis)、およびストレプトマイセス・ハイドロゲナンス (Streptomyces hydrogenans) があげられる。

具体的な例としては、絶対配置がR体の3-ヒドロキシペンタンニトリルを得る場合には、アースロアスカス・ジャバネンシス (Arthroascus javanensis) IFO1848、キャンディダ・カンタレリ (Candida cantarellii) IFO1261、キャンディダ・フェンニカ (Candida fennica) CBS6087、キャンディダ・グラブラータ (Candida glabrata) IFO0005、キャンディダ・グロッパングッセリ (Candida gropengiesseri) IFO0659、キャンディダ・ケフイア (Candida kefyr) IAM4880、キャンディダ・マリス (Candida maris) IFO10003、キャンディダ・メリニイ (Candida melinii) IFO0747、キャンディダ・ムサエ (Candida musae) IFO1582、キャンディダ・パラルゴーサ (Candida pararugosa) IFO0966、キャンディダ・ピヌス (Candida pinus) IFO0741、キャンディダ・ソルボフィラ (Candida sorbophila) IFO1583、キャンディダ・テヌイス (Candida tenuis) IFO0716、キャンディダ・ユティリス (Candida

a. utilis) IFO0639、クリプトコッカス・キューパタス (Cryptococcus curvatus) IFO1159、クリプトコッカス・フュミコラス (Cryptococcus humicolus) CBS2822、デバリオマイセス・ハンセニイ (Debaryomyces hansenii) IFO0063、デバリオマイセス・ハンセニイ・バー・ファブリー (Debaryomyces hansenii var. fabryi) IFO0015、デバリオマイセス・ハンセニイ・バー・ハンセニイ (Debaryomyces hansenii var. hansenii) IFO0032、デバリオマイセス・マラム (Debaryomyces marama) IFO0668、デバリオマイセス・ネバレンシス (Debaryomyces nepalensis) IFO0039、デッケラ・アノマラ (Dekkera anomala) IFO0627、ゲオトリカム・キャンディダム (Geotrichum candidum) CBS187・67、ゲオトリカム・エリエンセ (Geotrichum eriense) ATCC22311、ゲオトリカム・ファーメンタス (Geotrichum fermentans) CBS452. 83、ギラモンデラ・セレノスポラ (Guilliermondella selenospora) IFO1850、イサチエンキア・オリエンタリス (Issatchenkia orientalis) IFO1279、イサチエンキア・テリコーラ (Issatchenkia terricola) IFO0933、クルイベロマイセス・マキシアヌス (Kluyveromyces marxianus) IFO0288、コマガテラ・パストリス (Komagataella pastoris) IFO0948、コマガテラ・パストリス (Komagataella pastoris) IFO1013、リボマイセス・スターキー (Lipomyces starkeyi) IF

00678、ロダロマイセス・エロンギスボラス (Lodderomyces elongisporus) IFO1676、メシュニコワ・ピカスビダータ (Metschnikowia bicuspidata) IFO1408、メシュニコワ・グルエシー (Metschnikowia gruessii) IFO0749、オガタエア・ピニ (Ogataea pini) IFO1342、オガタエア・ウィッカーハミー (Ogataea wickerhamii) IFO1706、ピキア・アノマラ (Pichia anomala) IFO0120、ピキア・アノマラ (Pichia anomala) IFO0144、ピキア・アノマラ (Pichia anomala) IFO0146、ピキア・カナデンシス (Pichia canadensis) IFO0976、ピキア・ジャディニー (Pichia jadinii) IFO0987、ピキア・ペタソニー (Pichia petersonii) IFO1372、ピキア・ロダネンシス (Pichia rhodanensis) IFO1272、ピキア・シルビコラ (Pichia silvicola) IFO0807、ピキア・トリアングラリス (Pichia triangularis) IFO0836、ロードトルーラ・ラクトーサ (Rhodotorula lactosa) IFO1423、ロードトルーラ・ルブラ (Rhodotorula rubra) IFO0383、ロドスポリディウム・ディオボバタム (Rhodsporidium diobovatum) IFO0688、ロドスポリディウム・スファエロカーブム (Rhodsporidium sphaerocarpum) IFO1438、ロドスポリディウム・トルロイデス (Rhodsporidium toruloides) IFO0413、シュワニオマイセス・オシデンタリス・パー・オシデンタリス (Schwanniomyces occidentalis var. occidentalis) IFO1840

、ステファノアスカス・シフェリー (Stephanoascus ci  
ferrii) IFO1854、トルラスポラ・デルブルエッキー (To  
rulaspora delbrueckii) IFO0381、トリコ  
スポロン・キュタネウム (Trichosporon cutaneum  
) ATCC4151、ウイロプシス・サターナス・バー・ムラッキ (Wi  
lliopsis saturnus var. mrakii) IFO  
0895、ウイロプシス・サターナス・バー・サターナス (Willio  
psis saturnus var. saturnus) IFO0  
992、ウイロプシス・サターナス・バー・シュアベリレンス (Will  
iopsis saturnus var. suaveolens) I  
FO0809、ヤロア・リポリティカ (Yarrowia lipoly  
tica) IFO1741、アシディフィラム・クリプタム (Acide  
philium cryptum) IFO14242、アグロバクテリウ  
ム・ツメファシエンス (Agrobacterium tumefaci  
ence) IFO12667、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (Agrobacterium tumefaci  
ence) IFO132  
65、アルカリゲネス・エスピー (Alcaligenes sp.) I  
FO14130、アクロモバクター・キシロソキシダンス・サブスピー・  
デニトリフィカンス (Achromobacter xylosoxid  
ans subsp. denitrificans) ATCC1517  
3、アクロモバクター・キシロソキシダンス・サブスピー・デニトリフィ  
カンス (Achromobacter xylosoxidans su  
bsp. denitrificans) IFO12669、アースロバ  
クター・プロトフォーミ (Arthrobacter protopho  
rmiae) IFO12128、セルロモナス・ゲリダ (Cellulo  
monas gelida) IFO3748、コマモナス・テストステロ

ニ (Comamonas testosteroni) IFO12048  
、ミクロバクテリウム・アーボレスセンス (Microbacteriu  
m arborescens) IFO3750、ロドコッカス・イクイ (Rhodococcus equi) JCM1313、ロドコッカス・エ  
リイスロボリス (Rhodococcus erythropolis)  
IAM1452、ロドコッカス・エリイスロボリス (Rhodococ  
cus erythropolis) IFO12538、ロドコッカス・  
エリイスロボリス (Rhodococcus erythropolis  
) IFO12539、ロドコッカス・ロドクロウス (Rhodococc  
us rhodochrous) IFO3338、キャンディダ・マグノ  
リエ (Candida magnoliae) IFO0705、シテロマ  
イセス・マトリテンシス (Citeromyces matritens  
is) IFO0651、ピキア・ビスポーラ (Pichia bispo  
ra) IFO0803、トリコスポロン・ロウビエリ・バー・ロウビエリ  
(Trichosporon loubieri var. loubie  
ri) CBS7065、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス (Cor  
ynebacterium ammoniagenes) IFO1207  
2、コリネバクテリウム・フラベスセンス (Corynebacteri  
um flavescens) IFO14136、デボシア・リボフラビ  
ナ (Devosia riboflavina) IFO13584、ホフ  
ニア・アルベイ (Hofnia alvei) IFO3731、プロテウ  
ス・ブルガリス (Proteus vulgaris) IFO3167、  
プロビデンシア・アルカリファシエンシス (Providencia al  
califaciens) IFO12931、アブシディア・コエルレア  
(Absidia coerulea) IFO4011、アブシディア・  
ヒアロスポーラ (Absidia hyalospora) IFO8082

、アエグリタ・キャンディダ (Aegerita candida) IF  
O6988、アグロシベ・シリンドラッシ (Agrocybe cylly  
ndracea) IFO30299、アミロステレウム・アエロラタム (Amylostereum areolatum) IFO9221、アス  
パラギルス・ニガー (Aspergillus niger) IFO40  
91、アスパラギルス・フォエニシス (Aspergillus pho  
enicis) IFO6670、アスパラギルス・ソジャエ (Asper  
gillus sojae) IFO4244、コリナスカス・セペドニウ  
ム (Corynascucs sepedonium) IFO30067  
、デンドリフィエラ・サリナ (Dendryphiella salin  
a) IFO8281、エメリセラ・ニーデュランズ・バー・ニーデュラン  
ズ (Emericella nidulans var. nidulan  
s) IFO4340、エメリセラ・ウングイス (Emericella  
unguis) IFO8087、フサリウム・オキシスポラム (Fusa  
rium oxysporum) IFO5942、フサリウム・アングイ  
オイデス (Fusarium anguioides) IFO4467、  
ギベレラ・フジクロイ (Gibberella fujikuroi) I  
FO6603、グロメレラ・シングラータ (Glomerella ci  
ngulata) IFO5257、マクロフォーマ・コンメリナエ (Ma  
crophoma commelinae) IFO9569、ミクロネク  
トリエラ・ククメリス (Micronectriella cucume  
ris) IFO30005、モルチエレラ・イサベリーナ (Mortie  
rella isabellina) IFO7829、モルチエレラ・ラ  
マンニアナ・バー・アングリスボラ (Mortierella rama  
nniana var. angulisporea) IFO6744、ムコ  
ール・チューパーキュリスボラス (Mucor tuberculisp



orus) IFO9256、ムコール・イナエキュイスボラス (Mucor inaequisporus) IFO8624、ナンニジア・ギブシア・パー・インキュバータ (Nannizzia gypsea var. incurvata) IFO8306、ペニシリウム・キアメシウム (Penicillium chermesium) IFO5800、ペニシリウム・エクスパンサム (Penicillium expansum) IFO5854、フィアロフォラ・ファスティギアナ (Phialophora fastigiata) IFO6850、リゾプス・ニヴェウス (Rhizopus niveus) IFO4759、リゾプス・オリゼ (Rhizopus oryzae) IFO4705、スクレロチニア・スクレロチオラム (Sclerotinia sclerotiorum) IFO4876、スクレロチウム・デルフィニイ (Sclerotium delphini) IFO7337、ストレプトマイセス・カカオイ・サブスピー・アソエンシス (Streptomyces cacaoi subsp. asoensis) IFO13813、およびストレプトマイセス・エスピー (Streptomyces sp.) IFO13020があげられる。また、絶対配置がS体の3-ヒドロキシペンタンニトリルを得る場合には、キャンディダ・アルビカンス (Candida albicans) IFO0759、キャンディダ・ハエムロニー (Candida haemulonii) IFO10001、キャンディダ・インターメディア (Candida intermedia) IFO0761、キャンディダ・マルトーサ (Candida maltosa) IFO1977、キャンディダ・モギイ (Candida mogii) IFO0436、キャンディダ・オレオフィラ (Candida oleophila) CBS2219、ディボダスカス・オベテンシス (Dipodascus ovetensis) IFO1201、ディボダスカ

ス・テトラスパーマ (Dipodascus tetrasperma)  
CBS765. 70、ゲオトリカム・フラグランズ (Geotrichu  
m fragrans) CBS164. 32、ハイポピキア・バートニイ  
(Hypopichia burtonii) IFO0844、クルイベ  
ロマイセス・ポリスポラス (Kluyveromyces polysp  
orus) IFO0996、ピキア・スティピティス (Pichia s  
tipitis) CBS6054、シゾブラストスポリオン・コバヤシー  
(Schizoblastosporion kobayashi) IF  
O1644、シュワニオマイセス・オシデンタリス・バー・オシデンタリ  
ス (Schwanniomyces occidentalis var  
. occidentalis) IFO0371、ブレブンディモナス・ディ  
ミヌータ (Brevundimonas diminuta) IFO12  
697、パエニバシラス・アルベイ (Paenibacillus al  
vei) IFO3343、ロードトルーラ・グルチニス・ヴァー・ダイレ  
ネンシス (Rhodotorula glutinis var. dai  
renensis) IFO0415、シュードモナス・スタッツゼリ (P  
seudomonas stutzeri) IFO13596、シュード  
モナス・メンドシナ (Pseudomonas mendocina) I  
FO14162、ストレプトマイセス・コエレスセンス (Strepto  
myces coelestis) IFO13378、およびストレブ  
トマイセス・ハイドロゲナンス (Streptomyces hydro  
genans) IFO13475があげられる。

これら微生物は一般に、容易に入手可能な保存株から得ることができるが、自然界から単離することもできる。なお、これらの微生物に変異を生じさせて、より本反応に有利な性質を有する菌株を得ることもできる。本発明に有利な性質としては、例えば、3-ケトペンタンニトリルに対する

比活性の向上、立体選択性の向上などの性質があげられる。また、これらの微生物から、3-ケトペンタンニトリルを光学活性3-ヒドロキシペンタンニトリルに不斉還元する酵素をコードする遺伝子を遺伝子工学的手法によって単離し、任意の微生物に導入してもよい。

これらの微生物の培養には、通常、これらの微生物が資化可能な栄養源を含む培地であれば何でも使用できる。例えば、グルコース、スクロース、マルトース等の糖類、乳酸、酢酸、クエン酸、プロピオン酸等の有機酸類、エタノール、グリセリン等のアルコール類、パラフィン等の炭化水素類、大豆油、菜種油等の油脂類、またはこれらの混合物等の炭素源；硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、尿素、酵母エキス、肉エキス、ペプトン、コーンスチープリカー等の窒素源；その他の無機塩、ビタミン類等の栄養源などを適宜混合・配合した通常の培地を用いることができる。これら培地は用いる微生物の種類によって適宜選択すればよい。

微生物の培養は、通常、一般の条件により行なうことができ、例えば、pH 4.0～9.5、温度範囲20～45℃の範囲で、好氣的に10～96時間培養するのが好ましい。pHが4.0未満もしくは9.5を超える場合、または温度が20℃未満もしくは45℃を超える場合は、培養する微生物によっては、増殖しない場合や非常に増殖速度が遅い場合がある。

3-ケトペンタンニトリルに微生物を反応させる場合においては、通常、上記微生物の菌体を含む培養液をそのまま反応に使用することもできるが、培養液の濃縮物も用いることができる。濃縮方法としては、培養液から遠心分離、ろ過などにより菌体を集め、これを少量の培養上清、水、緩衝液などに懸濁する方法、遠心濃縮機を使用する方法などがあげられる。また、培養液中の成分が反応に影響を与える場合には、培養液を遠心分離などして得られた菌体または菌体処理物を使用することもできる。

菌体処理物としては特に限定されず、例えば、アセトンや五酸化二リン

による脱水処理またはデシケーターや扇風機を利用した乾燥によって得られる乾燥菌体、界面活性剤処理物、溶菌酵素処理物、固定化菌体または菌体を破碎した無細胞抽出標品などをあげることができる。さらに、培養物より不斉還元反応を触媒する酵素を精製し、これを使用してもよい。

還元反応の際には、基質である 3-ケトペンタンニトリルを反応の初期に一括して添加してもよく、反応の進行にあわせて分割して添加してもよい。また、反応の基質として、後で述べる 3-ケトペンタンニトリル・アルカリ金属塩も同様に使用可能である。反応時の温度は、好ましくは 10～60℃、より好ましくは 20～40℃であり、反応時の pH は、好ましくは 2.5～9、より好ましくは 5～9 である。温度が 10℃未満もしくは、60℃を超える場合、または pH が 2.5 未満もしくは 9 を超える場合は、使用する酵素源によっては反応が進行しなかったり、反応速度が非常に遅い場合がある。

反応液中の酵素量はこれらの基質を還元する能力に応じ適宜決定すればよい。また、反応液中の基質濃度は、0.01～50% (W/V) が好ましく、より好ましくは 0.1～30% (W/V) である。基質濃度が 0.01% (W/V) 未満の場合、反応液あたりの 3-ヒドロキシペンタンニトリルの生成量が少なく、効率が悪い。また、50% (W/V) を超える場合は、未反応の基質が残存する可能性が高く、生産性が悪くなる場合がある。反応は通常、振とうまたは通気攪拌しながら行なう。反応時間は基質濃度、酵素量およびその他の反応条件により適宜決定される。通常、2～168 時間で反応が終了するように各条件を設定することが好ましい。

還元反応を促進するために、反応液に、例えば、グルコース、エタノール、イソプロパノールなどのエネルギー源を 0.5～30% の割合で加えると優れた結果が得られるので好ましい。一般に生物学的方法による還元反応に必要とされている還元型ニコチンアミド・アデニンジヌクレオチド

(以下、NADHとする)、還元型ニコチンアミド・アデニンジヌクレオチドリリン酸(以下、NADPHとする)などの補酵素を添加することにより、反応を促進させることもできる。この場合、具体的には、反応液に直接これらを添加する。

また、還元反応を促進するために、 $\text{NAD}^+$ もしくは $\text{NADP}^+$ を還元型へ還元する酵素、および還元するための基質を共存させて反応を行うと優れた結果が得られるので好ましい。例えば、還元型へ還元する酵素としてグルコース脱水素酵素および還元するための基質としてグルコースを共存させるか、または、還元型へ還元する酵素としてギ酸脱水素酵素および還元するための基質としてギ酸を共存させる。

使用するグルコースの量は、3-ケトペンタンニトリルの等モル以上であればよく、また、グルコース脱水素酵素の添加量は、還元酵素の活性との関係によって決定される。同様に、使用するギ酸の量は、3-ケトペンタンニトリルの等モル以上であればよく、また、ギ酸脱水素酵素グルコース脱水素酵素の添加量は、還元酵素の活性との関係によって決定される。

またさらに、トリトン(ナカライテスク株式会社製)、スパン(関東化学株式会社製)、ツイーン(ナカライテスク株式会社製)などの界面活性剤を反応液に添加することも効果的である。さらに、基質および/または還元反応の生成物であるアルコール体による反応の阻害を回避する目的で、酢酸エチル、酢酸ブチル、イソプロピルエーテル、トルエン、ヘキサンなどの水に不溶な有機溶媒を反応液に添加してもよい。さらに、基質の溶解度を高める目的で、メタノール、エタノール、アセトン、テトラヒドロフラン、ジメチルスルホキシドなどの水に可溶な有機溶媒を添加することもできる。

還元反応により生成した光学活性3-ヒドロキシペンタンニトリルの採取方法は、特に限定されないが、反応液から直接、あるいは菌体等を分離

した後に、酢酸エチル、トルエン、*n*-ブチルメチルエーテル、ヘキサン等の溶剤で抽出し、脱水した後、蒸留あるいはシリカゲルカラムクロマトグラフィー等により精製すれば高純度の光学活性 3-ヒドロキシペンタンニトリルを容易に得ることができる。

変換反応の後、適当な有機溶媒で抽出を行ない、生成する 3-ヒドロキシペンタンニトリルをキャピラリーガスクロマトグラフィーなどにより分析することで、生成した 3-ヒドロキシペンタンニトリルのモル収率、絶対配置および光学純度を求めることができる。

次に 3-ケトペンタンニトリル・アルカリ金属塩について述べる。

アルカリ金属塩基の存在下で、プロピオン酸エステルとアセトニトリルより 3-ケトペンタンニトリルを合成する。使用する塩基としては、例えばナトリウムエトキシド、ナトリウムメトキシド、水素化ナトリウム、カリウムエトキシド、カリウムメトキシド、水素化カリウム、水素化リチウムなどのアルカリ金属塩基が好ましい。これらのなかでも、収率などの点から、水素化ナトリウムがより好ましい。プロピオン酸エステルとしては、例えばプロピオン酸メチル、プロピオン酸エチル、プロピオン酸ブチルなどがあげられる。反応時の溶媒としては、例えば、テトラヒドロフラン、エーテル、ベンゼン、エタノール、メタノールなどが好ましい。これらのなかでも、収率などの点から、テトラヒドロフランより好ましい。反応温度は、反応の進行を確認しながら適時設定すればよいが、好ましくは還流条件下で実施するのがよい。

上記のような条件で反応を行い、3-ケトペンタンニトリルの生成が確認できれば、反応液を冷却することにより、3-ケトペンタンニトリル・アルカリ金属塩を白色結晶として析出させることが可能である。また、反応液中に 3-ケトペンタンニトリル・アルカリ金属塩を溶解させない溶媒を添加することによって、3-ケトペンタンニトリル・アルカリ金属塩を

析出させることも可能である。3-ケトペンタンニトリル・アルカリ金属塩を溶解させない溶媒としては、例えば、*n*-ヘキサン、ヘプタン、石油エーテルなどがあげられる。このように反応液中に析出した3-ケトペンタンニトリル・アルカリ金属塩は、反応液をろ過することにより単離することができる。なお、得られる3-ケトペンタンニトリル・アルカリ金属塩のアルカリ金属種は、合成反応時に使用したアルカリ金属種と同一となる。

得られた3-ケトペンタンニトリル・アルカリ金属塩は、先に述べたように、3-ケトペンタンニトリルと同様、酵素を作用させて光学活性3-ヒドロキシペンタンニトリルを合成する際の原料として使用することができる。

以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではない。なお、以下の記載において、「%」は特に断らない限り「重量%」を意味する。

#### 実施例1

グルコース40g、酵母エキス3g、リン酸水素二アンモニウム6.5g、リン酸二水素カリウム1g、硫酸マグネシウム7水和物0.8g、硫酸亜鉛7水和物60mg、硫酸鉄7水和物90mg、硫酸銅5水和物5mg、硫酸マンガン4水和物10mg、塩化ナトリウム100mg（いずれも1L当たり）からなる液体培地（pH7）5mlを大型試験管に分注し、120℃で20分間蒸気滅菌を行った。これらの液体培地に表1に示す微生物を無菌的に一白金耳接種して、30℃で72時間振とう培養した。培養後、各培養液2.5mlを遠心分離にかけて菌体を集め、各菌体をグルコース4%を含む100mMリン酸緩衝液0.5ml（pH6.5）に懸濁した。この菌体懸濁液を、あらかじめ3-ケトペンタンニトリル5mgをいれた試験管に加えて、30℃で24時間反応させた。反応後、各反応

液に1mlの酢酸エチルを加えてよく混合し、有機層の一部を下記のキャピラリーガスクロマトグラフィー分析条件で分析した。

〔キャピラリーガスクロマトグラフィー分析条件〕

カラム：ASTEC社製Chiradex G-TA (20m×0.25mm)、検出：FID、カラム温度：130℃、注入温度：200℃、検出温度：200℃、キャリアーガス：ヘリウム (100kPa)、スプリット比：100/1、溶出時間：(R)-3-ヒドロキシペンタンニトリル 3.23分、(S)-3-ヒドロキシペンタンニトリル 3.67分)

表1に生成物である3-ヒドロキシペンタンニトリルのモル収率、光学純度および絶対配置をまとめた。



表 1

微生物			モル収率 (%)	光学純度 (%e.e.)	絶対 配置
<u>Arthroascus</u>	<u>javanensis</u>	IFO 1848	5.9	85.1	R
<u>Candida</u>	<u>cantarellii</u>	IFO 1261	60.2	73.6	R
<u>Candida</u>	<u>magnoliae</u>	IFO 0705	30.0	77.0	R
<u>Candida</u>	<u>glabrata</u>	IFO 0005	5.3	82.4	R
<u>Candida</u>	<u>gropengiesseri</u>	IFO 0659	56.9	81.7	R
<u>Candida</u>	<u>pararugosa</u>	IFO 0966	39.1	83.1	R
<u>Candida</u>	<u>pinus</u>	IFO 0741	14.9	80.7	R
<u>Candida</u>	<u>sorbophila</u>	IFO 1583	41.0	74.7	R
<u>Candida</u>	<u>fennica</u>	CBS 6087	67.0	76.2	R
<u>Candida</u>	<u>tenuis</u>	IFO0716	9.0	75.0	R
<u>Citeromyces</u>	<u>matritensis</u>	IFO 0651	7.7	89.5	R
<u>Cryptococcus</u>	<u>curvatus</u>	IFO 1159	52.1	75.5	R
<u>Cryptococcus</u>	<u>humicola</u>	CBS 2822	61.2	75.2	R
<u>Debaryomyces</u>	<u>hansenii</u> var. <u>fabryi</u>	IFO 0015	67.8	87.1	R
<u>Debaryomyces</u>	<u>marama</u>	IFO 0668	36.7	79.8	R
<u>Debaryomyces</u>	<u>nepalensis</u>	IFO 0039	44.1	94.8	R
<u>Geotrichum</u>	<u>candidum</u>	CBS 187.67	55.0	76.7	R
<u>Geotrichum</u>	<u>eriense</u>	ATCC 22311	60.1	74.6	R
<u>Geotrichum</u>	<u>fermentans</u>	CBS 452.83	58.2	78.7	R
<u>Guilliermondella</u>	<u>selenospora</u>	IFO 1850	63.7	77.3	R
<u>Issatchenkia</u>	<u>terricola</u>	IFO 0933	13.0	87.3	R
<u>Komagataella</u>	<u>pastoris</u>	IFO 0948	6.9	83.1	R
<u>Komagataella</u>	<u>pastoris</u>	IFO 1013	5.7	85.5	R
<u>Lipomyces</u>	<u>starkeyi</u>	IFO 0678	26.3	79.2	R
<u>Ogataea</u>	<u>pini</u>	IFO 1342	5.0	86.1	R
<u>Pichia</u>	<u>anomala</u>	IFO 0146	12.5	85.6	R
<u>Pichia</u>	<u>silvicola</u>	IFO 0807	68.0	75.7	R
<u>Rhodsporidium</u>	<u>sphaerocarpum</u>	IFO 1438	51.2	74.2	R
<u>Rhodsporidium</u>	<u>toruloides</u>	IFO 0413	72.1	76.9	R
<u>Rhodotorula</u>	<u>rubra</u>	IFO 0383	6.2	70.7	R
<u>Trichosporon</u>	<u>cutaneum</u>	ATCC 4151	18.4	94.0	R
<u>Yarrowia</u>	<u>lipolytica</u>	IFO 1741	6.2	82.3	R

## 実施例 2

表 2 に記載の微生物を、実施例 1 と同様の方法にて培養し、集菌した。

そして、各菌体を  $\text{NAD}^+$  0.739mg、 $\text{NADP}^+$  0.862mg、

グルコース 13.9 mg、グルコース脱水素酵素（商品名：GLUCDH “Amano” II、天野製薬株式会社製）3 Uを添加した100 mMリン酸緩衝液（pH 6.5）0.5 mlに懸濁した。この菌体懸濁液を、あらかじめ3-ケトペンタンニトリル 5 mg および酢酸ブチル 0.5 mlをいれた試験管に加えて、30℃で24時間反応させた。反応後、各反応液に0.5 mlの酢酸エチルを加えてよく混合し、有機層の一部を実施例1と同一の分析法で分析した。表2に生成物である3-ヒドロキシペンタンニトリルのモル収率、光学純度および絶対配置をまとめた。

表 2

微生物			モル収率 (%)	光学純度 (%e.e.)	絶対 配置
<i>Candida</i>	<i>glabrata</i>	IFO 0005	6.9	76.4	R
<i>Candida</i>	<i>gropengiesseri</i>	IFO 0659	11.3	83.0	R
<i>Candida</i>	<i>kefyr</i>	IAM 4880	19.1	76.9	R
<i>Candida</i>	<i>pinus</i>	IFO 0741	8.1	79.6	R
<i>Candida</i>	<i>utilis</i>	IFO 0639	18.2	81.0	R
<i>Cryptococcus</i>	<i>humicola</i>	CBS 2822	5.2	83.5	R
<i>Debaryomyces</i>	<i>hansenii</i>	IFO 0063	11.1	83.8	R
<i>Debaryomyces</i>	<i>hansenii</i> var. <i>hansenii</i>	IFO 0032	9.8	83.2	R
<i>Debaryomyces</i>	<i>hansenii</i> var. <i>fabryi</i>	IFO 0015	9.6	85.8	R
<i>Dekkera</i>	<i>anomala</i>	IFO 0627	9.7	86.0	R
<i>Kluyveromyces</i>	<i>marxianus</i>	IFO 0288	15.3	90.8	R
<i>Komagataella</i>	<i>pastoris</i>	IFO 0948	50.2	83.3	R
<i>Metschnikowia</i>	<i>bicuspidata</i>	IFO 1408	15.3	80.8	R
<i>Metschnikowia</i>	<i>gruessii</i>	IFO 0749	11.1	78.6	R
<i>Pichia</i>	<i>anomala</i>	IFO 0120	18.7	87.8	R
<i>Pichia</i>	<i>anomala</i>	IFO 0144	10.2	80.8	R
<i>Pichia</i>	<i>bispora</i>	IFO 0803	4.3	92.9	R
<i>Pichia</i>	<i>jadinii</i>	IFO 0987	29.9	78.1	R
<i>Pichia</i>	<i>petersonii</i>	IFO 1372	9.9	75.8	R
<i>Pichia</i>	<i>silvicola</i>	IFO 0807	24.1	76.2	R
<i>Rhodotorula</i>	<i>lactosa</i>	IFO 1423	6.5	76.3	R
<i>Schwanniomyces</i>	<i>occidentalis</i> var. <i>occidentalis</i>	IFO 1840	10.6	79.3	R
<i>Stephanoascus</i>	<i>ciferrii</i>	IFO 1854	8.7	76.7	R
<i>Torulaspora</i>	<i>delbrueckii</i>	IFO 0381	10.9	86.2	R
<i>Trichosporon</i>	<i>loubieri</i> var. <i>loubieri</i>	CBS 7065	7.7	85.1	R
<i>Williopsis</i>	<i>saturnus</i> var. <i>suaveolens</i>	IFO 0809	17.0	87.3	R
<i>Williopsis</i>	<i>saturnus</i> var. <i>saturnus</i>	IFO 0992	16.3	87.6	R
<i>Yarrowia</i>	<i>lipolytica</i>	IFO 1741	6.2	79.8	R
<i>Candida</i>	<i>haemulonii</i>	IFO 10001	18.3	82.8	S
<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	IFO 0759	7.2	88.2	S
<i>Dipodascus</i>	<i>ovetensis</i>	IFO 1201	27.7	62.4	S
<i>Dipodascus</i>	<i>tetrasperma</i>	CBS 765.70	54.6	81.1	S
<i>Geotrichum</i>	<i>fragrans</i>	CBS 164.32	32.9	86.5	S
<i>Hyphopichia</i>	<i>burtonii</i>	IFO 0844	13.8	80.9	S
<i>Kluyveromyces</i>	<i>polysporus</i>	IFO 0996	3.3	74.7	S
<i>Pichia</i>	<i>stipitis</i>	CBS 6054	31.3	64.5	S
<i>Rhodotorula</i>	<i>glutinis</i> var. <i>dairenensis</i>	IFO 0415	5.7	75.7	S
<i>Schwanniomyces</i>	<i>occidentalis</i> var. <i>occidentalis</i>	IFO 0371	32.2	85.3	S

### 実施例 3

グルコース 40 g、酵母エキス 3 g、リン酸水素二アンモニウム 6.5 g、リン酸二水素カリウム 1 g、硫酸マグネシウム 7 水和物 0.8 g、硫酸亜鉛 7 水和物 60 mg、硫酸鉄 7 水和物 90 mg、硫酸銅 5 水和物 5 mg、硫酸マンガン 4 水和物 10 mg、塩化ナトリウム 100 mg（いずれも 900 ml 当たり）からなる液体培地 45 ml およびアデカノール 1 滴を 500 ml 容坂口フラスコに入れて滅菌し、これに滅菌済みの 40 % グルコース水溶液 5 ml を加え、表 3 に記載の微生物—白金耳を無菌的に接種し、30℃で 72 時間振とう培養した。培養後、遠心分離により菌体を集め、イオン交換水で 2 回洗浄し、湿菌体をイオン交換水 40 ml に懸濁した。氷冷下で攪拌しながらアセトン 1.2 L を加え、氷中下で 30 分間攪拌した。これをろ過後、冷却したアセトンで濾紙上の菌体を洗浄し、減圧下で乾燥させ、表 3 に記載の微生物のアセトン乾燥菌体をそれぞれ取得した。

以上の方法で得られた各アセトン乾燥菌体について、アセトン乾燥菌体 10 mg、NAD<sup>+</sup> 0.739 mg、グルコース 13.9 mg、グルコース脱水素酵素（商品名：GLUCDH “Amano” II、天野製薬株式会社製）3 U、100 mM リン酸緩衝液（pH 6.5）0.5 ml、3-ケトペンタンニトリル 5 mg を試験管に加えて、30℃で 24 時間反応させた。反応後、各反応液に 1 ml の酢酸エチルを加えてよく混合し、有機層の一部を実施例 1 と同一の分析法で分析した。表 3 に生成物である 3-ヒドロキシペンタンニトリルのモル収率、光学純度および絶対配置をまとめた。

表 3

微生物			モル 収率 (%)	光学 純度 (%e.e.)	絶対 配置
<u>Candida</u>	<u>maris</u>	IFO 10003	22.0	79.0	R
<u>Candida</u>	<u>melinii</u>	IFO 0747	18.0	94.5	R
<u>Issatchenkia</u>	<u>orientalis</u>	IFO 1279	25.2	54.9	R
<u>Issatchenkia</u>	<u>terricola</u>	IFO 0933	8.2	73.7	R
<u>Ogataea</u>	<u>pini</u>	IFO 1342	3.8	73.4	R
<u>Ogataea</u>	<u>wickerhamii</u>	IFO 1706	13.9	71.7	R
<u>Pichia</u>	<u>anomala</u>	IFO 0120	31.1	88.7	R
<u>Pichia</u>	<u>anomala</u>	IFO 0144	14.0	79.0	R
<u>Pichia</u>	<u>canadensis</u>	IFO 0976	32.3	75.6	R
<u>Williopsis</u>	<u>saturnus</u> var. <u>mrakii</u>	IFO 0895	36.7	83.0	R
<u>Williopsis</u>	<u>saturnus</u> var. <u>saturnus</u>	IFO 0992	20.7	88.2	R
<u>Williopsis</u>	<u>saturnus</u> var. <u>suavcolens</u>	IFO 0809	54.0	83.8	R
<u>Yarrowia</u>	<u>lipolytica</u>	IFO 1741	12.8	78.7	R
<u>Candida</u>	<u>intermedia</u>	IFO 0761	23.2	75.7	S
<u>Candida</u>	<u>maltosa</u>	IFO 1977	31.8	91.5	S
<u>Candida</u>	<u>mogii</u>	IFO 0436	43.8	90.8	S
<u>Candida</u>	<u>oleophila</u>	CBS 2219	49.0	89.2	S
<u>Candida</u>	<u>albicans</u>	IFO 0759	23.5	93.5	S
<u>Schizoblastosporion</u>	<u>kobayashii</u>	IFO 1644	37.2	87.7	S

## 実施例 4

実施例 3 記載と同様の方法で、表 4 記載の微生物のアセトン乾燥菌体をそれぞれ取得した。得られた各アセトン乾燥菌体について、アセトン乾燥菌体 10 mg、NADP<sup>+</sup> 0.862 mg、グルコース 13.9 mg、グルコース脱水素酵素（商品名：GLUCDH “Amano” II、天野製薬株式会社製）3 U、100 mM リン酸緩衝液（pH 6.5）0.5 ml、3-ケトペンタンニトリル 5 mg を試験管に加えて、30℃で24時間反応させた。反応後、各反応液に 1 ml の酢酸エチルを加えてよく混合し、有機層の一部を実施例 1 と同一の分析法で分析した。表 4 に生成物である

3-ヒドロキシペンタンニトリルのモル収率、光学純度および絶対配置をまとめた。

表 4

微生物			モル 収率 (%)	光学 純度 (%e.e.)	絶対 配置
<i>Candida</i>	<i>glabrata</i>	IFO 0005	13.3	78.8	R
<i>Candida</i>	<i>gropengiesseri</i>	IFO 0659	30.1	79.7	R
<i>Candida</i>	<i>melinii</i>	IFO 0747	14.4	89.9	R
<i>Candida</i>	<i>musae</i>	IFO 1582	20.4	84.0	R
<i>Candida</i>	<i>sorbophila</i>	IFO 1583	21.8	79.5	R
<i>Candida</i>	<i>tenuis</i>	IFO 0716	11.1	81.4	R
<i>Cryptococcus</i>	<i>humicola</i>	CBS 2822	16.4	82.5	R
<i>Debaryomyces</i>	<i>hansenii</i>	IFO 0063	15.2	84.7	R
<i>Debaryomyces</i>	<i>hansenii</i> var. <i>hansenii</i>	IFO 0032	16.0	82.3	R
<i>Debaryomyces</i>	<i>hansenii</i> var. <i>fabryi</i>	IFO 0015	17.5	86.2	R
<i>Dekkera</i>	<i>anomala</i>	IFO 0627	14.3	80.5	R
<i>Issatchenkia</i>	<i>orientalis</i>	IFO 1279	17.4	50.8	R
<i>Issatchenkia</i>	<i>terricola</i>	IFO 0933	6.9	70.3	R
<i>Lodderomyces</i>	<i>elongisporus</i>	IFO 1676	12.5	77.4	R
<i>Metschnikowia</i>	<i>bicuspidata</i>	IFO 1408	15.3	79.3	R
<i>Ogataea</i>	<i>pini</i>	IFO 1342	4.5	76.8	R
<i>Ogataea</i>	<i>wickerhamii</i>	IFO 1706	6.8	59.7	R
<i>Pichia</i>	<i>anomala</i>	IFO 0120	32.2	88.2	R
<i>Pichia</i>	<i>anomala</i>	IFO 0144	10.3	76.5	R
<i>Pichia</i>	<i>rhodanensis</i>	IFO 1272	46.5	85.0	R
<i>Pichia</i>	<i>triangularis</i>	IFO 0836	11.8	79.9	R
<i>Rhodsporidium</i>	<i>diobovatum</i>	IFO 0688	21.4	81.1	R
<i>Rhodsporidium</i>	<i>sphaerocarpum</i>	IFO 1438	13.7	78.8	R
<i>Rhodotorula</i>	<i>rubra</i>	IFO 0383	28.0	76.3	R
<i>Williopsis</i>	<i>saturnus</i> var. <i>saturnus</i>	IFO 0992	14.8	87.1	R
<i>Yarrowia</i>	<i>lipolytica</i>	IFO 1741	36.9	81.4	R
<i>Candida</i>	<i>mogii</i>	IFO 0436	41.7	69.3	S
<i>Dipodascus</i>	<i>tetrasperma</i>	CBS 765.70	18.9	71.8	S

## 実施例 5

肉エキス 10 g、ペプトン 10 g、酵母エキス 5 g、塩化ナトリウム 3 g（いずれも 1 L 当たり）からなる液体培地（pH 7）7 ml を大型試験管に分注し、120℃で20分間蒸気滅菌を行った。これらの液体培地に表 5 に示す微生物を無菌的に一白金耳接種して、30℃で36時間振とう培養した。培養後、各培養液 3.5 ml を遠心分離にかけて菌体を集め、各菌体をグルコース 8% を含んだ 100 mM リン酸緩衝液 0.5 ml（pH 6.5）に懸濁した。この菌体懸濁液を、あらかじめ 3-ケトペンタンニトリルを 5 mg 入れた試験管に加えて、30℃で18時間反応させた。反応後、実施例 1 と同様に分析を行った。表 5 に生成物である 3-ヒドロキシペンタンニトリルの反応液当たりのモル収率、光学純度および絶対配置をまとめた。

表 5

微生物			モル収率 (%)	光学純度 (%e.e.)	絶対 配置
<u>Achromobacter</u>	<u>xylooxidans subsp. denitrificans</u>	IFO 12669	8.9	77.4	R
<u>Achromobacter</u>	<u>xylooxidans subsp. denitrificans</u>	ATCC 15173	18.3	78.3	R
<u>Arthrobacter</u>	<u>protophormiae</u>	IFO 12128	12.8	77.3	R
<u>Acidiphilium</u>	<u>cryptum</u>	IFO 14242	6.2	91.3	R
<u>Cellulomonas</u>	<u>gelida</u>	IFO 3748	7.1	84.1	R
<u>Corynebacterium</u>	<u>ammoniagenes</u>	IFO 12072	7.7	79.9	R
<u>Corynebacterium</u>	<u>flavescens</u>	IFO 14136	5.7	78.4	R
<u>Devosia</u>	<u>riboflavina</u>	IFO 13584	7.0	85.7	R
<u>Microbacterium</u>	<u>arborescens</u>	IFO 3750	6.3	71.0	R
<u>Rhodococcus</u>	<u>erythropolis</u>	IFO 12538	9.6	79.6	R
<u>Rhodococcus</u>	<u>erythropolis</u>	IFO 12539	5.0	70.3	R
<u>Rhodococcus</u>	<u>erythropolis</u>	IAM 1452	15.0	80.0	R
<u>Rhodococcus</u>	<u>rhodochrous</u>	IFO 3338	5.5	87.9	R

## 実施例 6

表 6 に記載の微生物を、実施例 5 と同様の方法にて培養、集菌を行った。そして各菌体を、NAD<sup>+</sup> 0.739 mg、NADP<sup>+</sup> 0.862 mg、

グルコース 13.9 mg、グルコース脱水素酵素（商品名：GLUCDH “Amano” II、天野製薬株式会社製）3 Uを添加した100 mMリン酸緩衝液（pH 6.5）0.5 mlに懸濁した。この菌体懸濁液を、あらかじめ3-ケトペンタンニトリル5 mgおよび酢酸ブチル0.5 mlをいれた試験管に加えて、30℃で24時間反応させた。反応後、各反応液に0.5 mlの酢酸エチルを加えてよく混合し、有機層の一部を実施例1と同一の分析法で分析した。表6に生成物である3-ヒドロキシペンタンニトリルのモル収率、光学純度および絶対配置をまとめた。

表 6

微生物			モル収率 (%)	光学純度 (%e.e.)	絶対 配置
<i>Alcaligenes</i>	sp.	IFO 14130	3.5	78.0	R
<i>Agrobacterium</i>	<i>tumefaciens</i>	IFO 12667	3.6	73.4	R
<i>Agrobacterium</i>	<i>tumefaciens</i>	IFO 13265	3.1	71.2	R
<i>Comamonas</i>	<i>testosteroni</i>	IFO 12048	14.3	78.5	R
<i>Hofnia</i>	<i>alvei</i>	IFO 3731	5.0	86.6	R
<i>Proteus</i>	<i>vulgaris</i>	IFO 3167	3.5	79.9	R
<i>Providencia</i>	<i>alcalifaciens</i>	IFO 12931	3.5	83.1	R
<i>Rhodococcus</i>	<i>equi</i>	JCM 1313	4.1	76.3	R
<i>Brevundimonas</i>	<i>diminuta</i>	IFO 12697	70.0	63.5	S
<i>Paenibacillus</i>	<i>alvei</i>	IFO 3343	5.7	76.4	S
<i>Pseudomonas</i>	<i>stutzeri</i>	IFO 13596	24	50.5	S
<i>Pseudomonas</i>	<i>mendocina</i>	IFO 14162	3.7	45.9	S

## 実施例7

60%水素化ナトリウム22 gをテトラヒドロフラン400 mlに懸濁した。そして、加熱しながら、アセトニトリル24.7 g、続けてプロピオン酸エチル58.3 gを滴下し、80℃で一晩攪拌した。室温まで自然放冷後、さらに氷水中で冷却した。析出した白色結晶をろ過により取得し、n-ヘキサン350 mlで洗浄後、減圧下で乾燥を行った。白色結晶の3-ケトペンタンニトリル・ナトリウム塩45.0 gを取得した。



## 実施例 8

60%水素化ナトリウム40gをテトラヒドロフラン300mlに懸濁した。そして、加熱しながら、アセトニトリル49.3g、続けてプロピオン酸エチル122.56gを滴下し、80℃で一晩攪拌した。室温まで自然放冷後、さらに氷水中で冷却しながらn-ヘキサン300mlを添加した。析出した白色結晶をろ過により取得し、n-ヘキサン500mlで洗浄後、減圧下で乾燥を行った。白色結晶の3-ケトペンタンニトリル・ナトリウム塩98.7gを取得した。

## 実施例 9

Candida gropengiesseri IFO0659について、実施例3と同様の方法で培養を行い、得られた培養液1Lを遠心分離し、菌体を集め、グルコース4%を含んだ100mMリン酸緩衝液200ml (pH6.5) に懸濁した。この菌体懸濁液に、6N塩酸を用いて、pH6.5を保ちながら3-ケトペンタンニトリル・ナトリウム塩1.19gを添加した。添加後30℃で24時間攪拌することにより反応を行った。反応終了後、酢酸エチルで抽出し、水相をさらに酢酸エチルで抽出した。有機相を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、減圧下で溶媒を留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製を行った。3-ヒドロキシペンタンニトリル842mgを取得した。実施例1に記載の方法で光学純度を求めたところ、R体で81.7% e. e. であった。<sup>1</sup>H-NMR  $\delta$  (CDCl<sub>3</sub>) : 1.00 (3H, t)、1.64 (2H, dq)、2.27 (1H, s)、2.54 (2H, dd)、3.86–3.92 (1H, m)。

## 実施例 10

表 7 に記載の微生物を、グルコース 5 %、コーンスチープリカー 5 % からなる培地 (pH 6.0) で培養した以外は、実施例 1 と同様に反応、分析を行った。表 7 に生成物である 3-ヒドロキシペンタンニトリルのモル収率、光学純度及び絶対配置をまとめた。

表 7

微生物			モル収率 (%)	光学純度 (%e.e.)	絶対 配置
<i>Absidia</i>	<i>coerulea</i>	IFO 4011	17.4	84.6	R
<i>Absidia</i>	<i>hyalospora</i>	IFO 8082	10.8	87.9	R
<i>Aegerita</i>	<i>candida</i>	IFO 6988	6.1	86.8	R
<i>Agrocyste</i>	<i>cylyndracea</i>	IFO 30299	14.7	88.1	R
<i>Amylostereum</i>	<i>areolatum</i>	IFO 9221	12.9	87.8	R
<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>	IFO 4091	5.6	87.9	R
<i>Aspergillus</i>	<i>phoenicis</i>	IFO 6670	3.7	87.3	R
<i>Aspergillus</i>	<i>sojae</i>	IFO 4244	6.5	86.7	R
<i>Corynascus</i>	<i>sepedonium</i>	IFO 30067	17.2	80.0	R
<i>Dendryphiella</i>	<i>salina</i>	IFO 8281	12.8	81.6	R
<i>Emericella</i>	<i>nidulans</i> var. <i>nidulans</i>	IFO 4340	6.9	88.1	R
<i>Emericella</i>	<i>unguis</i>	IFO 8087	73.0	85.3	R
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	IFO 5942	35.7	88.5	R
<i>Fusarium</i>	<i>anguioides</i>	IFO 4467	13.2	84.9	R
<i>Gibberella</i>	<i>fujikuroi</i>	IFO 6603	16.1	85.7	R
<i>Glomerella</i>	<i>cingulata</i>	IFO 5257	21.7	86.1	R
<i>Macrophoma</i>	<i>commelinae</i>	IFO 9569	40.6	74.1	R
<i>Micronectriella</i>	<i>cucumeris</i>	IFO 30005	26.7	80.8	R
<i>Mortierella</i>	<i>isabellina</i>	IFO 7829	59.9	85.2	R
<i>Mortierella</i>	<i>ramanniana</i> var. <i>angulispora</i>	IFO 6744	23.1	86.2	R
<i>Mucor</i>	<i>tuberculisporus</i>	IFO 9256	61.0	82.6	R
<i>Mucor</i>	<i>inaequisporus</i>	IFO 8624	56.5	84.0	R
<i>Nannizzia</i>	<i>gypsea</i> var. <i>incurvata</i>	IFO 8306	20.5	87.6	R
<i>Penicillium</i>	<i>chermesium</i>	IFO 5800	26.7	86.9	R
<i>Penicillium</i>	<i>expansum</i>	IFO 5854	14.9	85.8	R
<i>Phialophora</i>	<i>fastigiata</i>	IFO 6850	8.6	87.4	R
<i>Rhizopus</i>	<i>niveus</i>	IFO 4759	12.9	82.0	R
<i>Rhizopus</i>	<i>oryzae</i>	IFO 4705	13.0	81.8	R
<i>Sclerotinia</i>	<i>sclerotiorum</i>	IFO 4876	6.0	87.7	R
<i>Sclerotium</i>	<i>delphinii</i>	IFO 7337	13.9	87.2	R

## 実施例 11

表 8 に記載の微生物を、D i f c o 社製トリブチックイブロス 3 %、可溶性でんぷん 1 % からなる培地 (pH 7. 2) で培養した以外は、実施例 1 と同様に反応、分析を行った。表 8 に生成物である 3 - ヒドロキシペンタンニトリルのモル収率、光学純度及び絶対配置をまとめた。

表 8

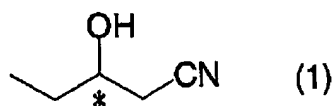
微生物			モル収率 (%)	光学純度 (%e.e.)	絶対 配置
<u>Streptomyces</u>	<u>cacaoi</u> subsp. <u>asoensis</u>	IFO 13813	5.3	64.5	R
<u>Streptomyces</u>	sp.	IFO 13020	3.7	53.7	R
<u>Streptomyces</u>	<u>coelestis</u>	IFO 13378	12.2	39.2	S
<u>Streptomyces</u>	<u>hydrogenans</u>	IFO 13475	3.5	51.5	S

## 産業上の利用可能性

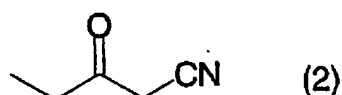
本発明は、不斉還元活性を有する酵素を作用させて、3 - ケトペンタンニトリルを立体選択的に還元することにより光学活性 3 - ヒドロキシペンタンニトリルを高収率で製造することができる。また、保存の面でも問題がなく、安定な化合物である 3 - ケトペンタンニトリル・アルカリ金属塩を効率的に取得することができる。

## 請求の範囲

## 1. 下記式 (1) :



で表される光学活性 3-ヒドロキシペンタンニトリルの製造方法であって、下記式 (2) :



で表される 3-ケトペンタンニトリルに、3-ケトペンタンニトリルを光学活性 3-ヒドロキシペンタンニトリルに不斉還元する酵素を作用させることにより、光学活性 3-ヒドロキシペンタンニトリルとする製造方法。

2. 酵素が、アースロアスカス (Arthroascus) 属、キャンディダ (Candida) 属、クリプトコッカス (Cryptococcus) 属、デバリオマイセス (Debaryomyces) 属、デッケラ (Dekkera) 属、ディポダスカス (Dipodascus) 属、ゲオトリカム (Geotrichum) 属、ギラモンデラ (Guilliermondella) 属、ハイホピキア (Hyphopichia) 属、イサチェンキア (Issatchenkia) 属、クルイベロマイセス (Kluyveromyces) 属、コマガテラ (Komagataella) 属、リボマイセス (Lipomyces) 属、ロドロマイセス (Lodderomyces) 属、メシュニコワ (Metschnikowia) 属、オガタエア (Ogataea) 属、ピキア

(Pichia) 属、ロドトルーラ (Rhodotorula) 属、ロ  
ドスポリディウム (Rhodsporidium) 属、シゾプラストス  
ポリオン (Schizoblastosporion) 属、シュワニオ  
マイセス (Schwanniomyces) 属、ステファノアスカス  
(Stephanoascus) 属、トルラスポラ (Torulasp  
ora) 属、トリコスポロン (Trichosporon) 属、ウイロ  
プシス (Williopsis) 属、ヤロア (Yarrowia) 属、  
アシディフィラム (Acidephillum) 属、アグロバクテリウ  
ム (Agrobacterium) 属、アルカリゲネス (Alcali  
genes) 属、アースロバクター (Arthrobacter) 属、  
ブレブンディモナス (Brevundimonas) 属、セルロモナス  
(Cellulomonas) 属、コマモナス (Comamonas)  
属、ミクロバクテリウム (Microbacterium) 属、パエニ  
バシラス (Paenibacillus) 属、ロドコッカス (Rhod  
ococcus) 属、シテロマイセス (Citeromyces) 属、  
アクロモバクター (Achromobacter) 属、コリネバクテリ  
ウム (Corynebacterium) 属、デボシア (Devosi  
a) 属、ホフニア (Hofnia) 属、プロテウス (Proteus)  
属、プロビデンシア (Providencia) 属、シュードモナス  
(Pseudomonas) 属、アブシディア (Absidia) 属、  
アエゲリタ (Aegerita) 属、アグロシベ (Agrocybe)  
属、アミロステレウム (Amylostereum) 属、アスパラギル  
ス (Aspergillus) 属、コリナスカス (Corynascu  
cs) 属、デンドリフィエラ (Dendryphiella) 属、エメ  
リセラ (Emericella) 属、フサリウム (Fusarium)  
属、ギベレラ (Gibberella) 属、グロメレラ (Glomer

ella) 属、マクロフォーマ (Macrophoma) 属、ミクロネクトリエラ (Micronectriella) 属、モルチエレラ (Mortierella) 属、ムコール (Mucor) 属、ナンニジア (Nannizzia) 属、ペニシリウム (Penicillium) 属、フィアロフォラ (Phialophora) 属、リゾプス (Rhizopus) 属、スクレロチニア (Sclerotinia) 属、スクレロチウム (Sclerotium) 属およびストレプトマイセス (Streptomyces) 属からなる群より選ばれる微生物の、菌体、培養液、それらの処理物中に存在する酵素、および/またはこれらの微生物から得られる精製酵素である、請求の範囲第1項記載の製造方法。

3. 生成物である光学活性3-ヒドロキシペンタンニトリルの絶対配置がR体であり、酵素が、アースロアスカス (Arthroascus) 属、キャンディダ (Candida) 属、クリプトコッカス (Cryptococcus) 属、デバリオマイセス (Debaryomyces) 属、デッケラ (Dekkera) 属、ゲオトリカム (Geotrichum) 属、ギラモンデラ (Guilliermondella) 属、イサチエンキア (Issatchenkia) 属、クルイベロマイセス (Kluyveromyces) 属、コマガテラ (Komagataella) 属、リボマイセス (Lipomyces) 属、ロダロマイセス (Lodderomyces) 属、メシュニコワ (Metschnikowia) 属、オガタエア (Ogataea) 属、ピキア (Pichia) 属、ロドトルーラ (Rhodotorula) 属、ロドスポリディウム (Rhodsporidium) 属、シュワニオマイセス (Schwanniomyces) 属、ステファノアスカス (Stephanosascus) 属、トルラスポラ (Torulaspora) 属、トリコスボロン (Trichosporon) 属、ウィロプシス (Williopsis) 属、

sis) 属、ヤロア (Yarrowia) 属、アシディフィラム (Acidophilium) 属、アグロバクテリウム (Agrobacterium) 属、アルカリゲネス (Alcaligenes) 属、アースロバクター (Arthrobacter) 属、セルロモナス (Cellulomonas) 属、コマモナス (Comamonas) 属、ミクロバクテリウム (Microbacterium) 属、ロドコッカス (Rhodococcus) 属、シテロマイセス (Citeromyces) 属、アクロモバクター (Achromobacter) 属、コリネバクテリウム (Corynebacterium) 属、デボシア (Devosia) 属、ホフニア (Hofnia) 属、プロテウス (Proteus) 属、プロビデンシア (Providencia) 属、アブシディア (Absidia) 属、アエゲリタ (Aegerita) 属、アグロシベ (Agrocybe) 属、アミロステレウム (Amylostereum) 属、アスパラギルス (Aspergillus) 属、コリナスカス (Corynascus) 属、デンドリフィエラ (Dendryphiella) 属、エメリセラ (Emericella) 属、フサリウム (Fusarium) 属、ギベレラ (Gibberella) 属、グロメレラ (Glomerella) 属、マクロフォーマ (Macrophoma) 属、ミクロネクトリエラ (Micronectriella) 属、モルチエレラ (Mortierella) 属、ムコール (Mucor) 属、ナンニジア (Nannizzia) 属、ペニシリウム (Penicillium) 属、フィアロフォラ (Phialophora) 属、リゾプス (Rhizopus) 属、スクレロチニア (Sclerotinia) 属、およびスクレロチウム (Sclerotium) 属、ストレプトマイセス (Streptomyces) 属からなる群より選ばれる微生物の、菌体、培養液、それらの処理物中に存在する

酵素、および／またはこれらの微生物から得られる精製酵素である、請求の範囲第1項記載の製造方法。

4. 生成物である光学活性3-ヒドロキシペンタンニトリルの絶対配置がR体であり、酵素が、アースロアスカス・ジャバネンシス (Arthroascus javanensis)、キャンディダ・カンタレリ (Candida cantarelli)、キャンディダ・フェニカ (Candida fennica)、キャンディダ・グラブラータ (Candida glabrata)、キャンディダ・グロップengiesserii (Candida gropengiesserii)、キャンディダ・ケフィア (Candida kefir)、キャンディダ・マリス (Candida maris)、キャンディダ・メリニイ (Candida melinii)、キャンディダ・ムサエ (Candida musae)、キャンディダ・パラルゴサ (Candida pararugosa)、キャンディダ・ピヌス (Candida pinus)、キャンディダ・ソルボフィラ (Candida sorbophila)、キャンディダ・テヌイス (Candida tenuis)、キャンディダ・ユティリス (Candida utilis)、クリプトコッカス・キューパタス (Cryptococcus curvatus)、クリプトコッカス・フュミコラス (Cryptococcus humicolus)、デバリオマイセス・ハンセニイ (Debaryomyces hansenii)、デバリオマイセス・ハンセニイ・パー・ファブリー (Debaryomyces hansenii var. fabryi)、デバリオマイセス・ハンセニイ・パー・ハンセニイ (Debaryomyces hansenii var. hansenii)、デバリオマイセス・マラマ (Debaryomyces marama)、デバリオマイセス・ネパレンシス (De



baryomyces nepalensis)、デッケラ・アノマラ (Dekkera anomala)、ゲオトリカム・キャンディダム (Geotrichum candidum)、ゲオトリカム・エリエンセ (Geotrichum eriense)、ゲオトリカム・ファーメンタス (Geotrichum fermentans)、ギラモンデラ・セレノスポラ (Guilliermondella selesenospora)、イサチエンキア・オリエンタリス (Issatchenkia orientalis)、イサチエンキア・テリコーラ (Issatchenkia terricola)、クルイベロマイセス・マキシアヌス (Kluyveromyces marxianus)、コマガテラ・パストリス (Komagataella pastoris)、リボマイセス・スターキー (Lipomyces starkeyi)、ロダロマイセス・エロンギスポラス (Lodderomyces elongisporus)、メシュニコワ・ピカスピダータ (Metschnikowia bicuspidata)、メシュニコワ・グルエシー (Metschnikowia gruessii)、オガタエア・ピニ (Ogataea pini)、オガタエア・ウィッカーハミー (Ogataea wickerhamii)、ピキア・アノマラ (Pichia anomala)、ピキア・カナデンシス (Pichia canadensis)、ピキア・ジャディニー (Pichia jadinii)、ピキア・ペタソニー (Pichia petersonii)、ピキア・ロダネンシス (Pichia rhodanensis)、ピキア・シルピコラ (Pichia silvicola)、ピキア・トリアングラリス (Pichia triangularis)、ロードトルーラ・ラクトーサ (Rhodotorula lactosa)、ロードトルーラ・ルプラ (Rhodotoru

la rubra)、ロドスポリディウム・ディオボバタム (Rhodsporidium diobovatum)、ロドスポリディウム・スファエロカープム (Rhodsporidium sphaerocarpum)、ロドスポリディウム・トルロイデス (Rhodsporidium toruloides)、シュワニオマイセス・オシデンタリス・バー・オシデンタリス (Schwanniomyces occidentalis var. occidentalis)、ステファノアスカス・シフェリー (Stephanoascus ciferrii)、トルラスボラ・デルブルエッキー (Torulaspora delbrueckii)、トリコスボロン・キュタネウム (Trichosporon cutaneum)、ウイロプシス・サターナス・バー・ムラッキ (Williopsis saturnus var. mrakii)、ウイロプシス・サターナス・バー・サターナス (Williopsis saturnus var. saturnus)、ウイロプシス・サターナス・バー・シュアベリレンス (Williopsis saturnus var. suaveolens)、ヤロア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica)、アシディフィラム・クリプタム (Acidephibium cryptum)、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens)、アルカリゲネス・エスピー (Alcaligenes sp.)、アクロモバクター・キシロソキシダンス・サブスピー・デニトリフィカンス (Achromobacter xylosoxidans subsp. denitrificans)、アースロバクター・プロトフォーミ (Arthrobacter protophormiae)、セルロモナス・ゲリダ (Cellulomonas gelida)、コマモナス・テストス

テロニ (Comamonas testosteroni)、ミクロバ  
クテリウム・アーボレスセンス (Microbacterium ar  
borescens)、ロドコッカス・イクイ (Rhodococcu  
s equi)、ロドコッカス・エリイスロポリス (Rhodococ  
cus erythropolis)、ロドコッカス・ロドクロウス (Rhodococcus rhodochrous)、キャンディダ・  
マグノリエ (Candida magnoliae)、シテロマイセス  
・マトリテンシス (Citeromyces matritensis  
)、ピキア・ビスポーラ (Pichia bispora)、トリコス  
ポロン・ロウビエリ・パー・ロウビエリ (Trichosporon  
loubieri var. loubieri)、コリネバクテリウム  
・アンモニアゲネス (Corynebacterium ammoni  
agenes)、コリネバクテリウム・フラベスセンス (Coryne  
bacterium flavescens)、デボシア・リボフラビ  
ナ (Devosia riboflavina)、ホフニア・アルベイ  
(Hofnia alvei)、プロテウス・ブルガリス (Prote  
us vulgaris)、プロピデンシア・アルカリファシエンス (Providencia alcalifaciens)、アブシディ  
ア・コエルレア (Absidia coerulea)、アブシディア  
・ヒアロスボラ (Absidia hyalospora)、アエゲリ  
タ・キャンディダ (Aegerita candida)、アグロシベ  
・シリンドラッシ (Agrocybe cylindracea)、ア  
ミロステレウム・アエロラタム (Amylostereum areo  
latum)、アスパラギルス・ニガー (Aspergillus n  
iger)、アスパラギルス・フォエニシス (Aspergillus  
phoenicis)、アスパラギルス・ソジャエ (Aspergi

llus sojae)、コリナスカス・セペドニウム (Coryna  
scucs sepedonium)、デンドリフィエラ・サリナ (D  
endryphiella salina)、エメリセラ・ニーデュラ  
ンス・バー・ニーデュランス (Emericella nidulan  
s var. nidulans)、エメリセラ・ウングイス (Emer  
icella unguis)、フサリウム・オキシスポラム (Fus  
arium oxysporum)、フサリウム・アングイオイデス (Fusarium  
anguioides)、ギベレラ・フジクロイ (Gibberella  
fujikuroi)、グロメレラ・シングラ  
ータ (Glomerella cingulata)、マクロフォーマ  
・コンメリナエ (Macrophoma commelinae)、ミ  
クロネクトリエラ・ククメリス (Micronectriella c  
ucumeris)、モルチエレラ・イサベリーナ (Mortiere  
lla isabellina)、モルチエレラ・ラマンニアナ・バー  
・アングリスボラ (Mortierella ramanniana  
var. angulispora)、ムコール・チューバーキュリスボ  
ラス (Mucor tuberculispurus)、ムコール・イ  
ナエキュイスボラス (Mucor inaequisporus)、ナ  
ンニジア・ギプシア・バー・インキュバータ (Nannizzia g  
ypsea var. incurvata)、ペニシリウム・キアメシ  
ウム (Penicillium chermesium)、ペニシリウ  
ム・エクスパンサム (Penicillium expansum)、  
フィアロフォラ・ファスティギアナ (Phialophora fas  
tigiata)、リゾプス・ニヴェウス (Rhizopus niv  
eus)、リゾプス・オライゼ (Rhizopus oryzae)、  
スクレロチニア・スクレロチオラム (Sclerotinia scl

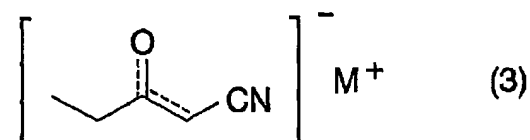
erotiorum)、スクレロチウム・デルフィニイ (Sclerotium delphini)、ストレプトマイセス・カカオイ・サブスピー・アソエンシス (Streptomyces cacaoi subsp. asoensis)、およびストレプトマイセス・エスピー (Streptomyces sp.) からなる群より選ばれる微生物の、菌体、培養液、それらの処理物中に存在する酵素、および/またはこれらの微生物から得られる精製酵素である、請求の範囲第1項記載の製造方法。

5. 生成物である光学活性3-ヒドロキシペンタンニトリルの絶対配置がS体であり、酵素が、キャンディダ (Candida) 属、ディボダスカス (Dipodascus) 属、ゲオトリカム (Geotrichum) 属、ハイポピキア (Hyphopichia) 属、クルイベロマイセス (Kluyveromyces) 属、ピキア (Pichia) 属、シゾブラストスポリオン (Schizoblastosporion) 属、シュワニオマイセス (Schwanniomyces) 属、ブレブディモナス (Brevundimonas) 属、パエニバシラス (Paenibacillus) 属、ロードトルーラ (Rhodotorula) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、およびストレプトマイセス (Streptomyces) 属からなる群より選ばれる微生物の、菌体、培養液、それらの処理物中に存在する酵素、および/またはこれらの微生物から得られる精製酵素である、請求の範囲第1項記載の製造方法。

6. 生成物である光学活性3-ヒドロキシペンタンニトリルの絶対配置がS体であり、酵素が、キャンディダ・アルビカンズ (Candida albicans)、キャンディダ・ハエムロニー (Candida haemulonii)、キャンディダ・インターメディア (Cand

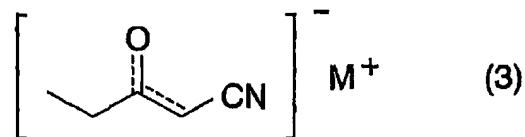
ida intermedia)、キャンディダ・マルトーサ (Candida maltosa)、キャンディダ・モギイ (Candida mogii)、キャンディダ・オレオフィラ (Candida oleophila)、ディボダスカス・オベテンシス (Dipodascus ovetensis)、ディボダスカス・テトラスパーマ (Dipodascus tetrasperma)、ゲオトリカム・フラグランス (Geotrichum fragrans)、ハイポピキア・パートニイ (Hypopichia burtonii)、クルイペロマイセス・ポリスポラス (Kluyveromyces polysporus)、ピキア・スティピティス (Pichia stipitidis)、シゾブラストスポリオン・コバヤシー (Schizoblastosporion kobayashii)、シュワニオマイセス・オシデンタリス・バー・オシデンタリス (Schwanniomyces occidentalis var. occidentalis)、ブレブンディモナス・ディミニヌータ (Brevundimonas diminuta)、パエニバシラス・アルベイ (Paenibacillus alvei)、ロードトルーラ・グルチニス・ヴァー・ダイレネンシス (Rhodotorula glutinis var. dairenensis)、シュードモナス・スタッツゼリ (Pseudomonas stutzeri)、シュードモナス・メンドシナ (Pseudomonas mendocina)、ストレプトマイセス・コエレスセンス (Streptomyces coelestis)、およびストレプトマイセス・ハイドロゲナンス (Streptomyces hydrogenans) からなる群より選ばれる微生物の、菌体、培養液、それらの処理物中に存在する酵素、および／またはこれらの微生物から得られる精製酵素である、請求の範囲第1項記載の製造方法。

7. 酸化型ニコチンアミド・アデニンジヌクレオチド (NAD<sup>+</sup>)、酸化型ニコチンアミド・アデニンジヌクレオチドリリン酸 (NADP<sup>+</sup>) のいずれかまたは両方を、それぞれの還元型へ還元する酵素および還元するための基質と共存させる請求の範囲第1項、第2項、第3項、第4項、第5項または第6項記載の製造方法。
8. 3-ケトペンタンニトリルとして、下記一般式 (3) :



(式中、Mはアルカリ金属を表す) で表される3-ケトペンタンニトリルアルカリ金属塩を使用する請求の範囲第1項、第2項、第3項、第4項、第5項、第6項または第7項記載の製造方法。

9. アルカリ金属塩基の存在下で、プロピオン酸エステルとアセトニトリルより3-ケトペンタンニトリルを合成し、この反応系中から3-ケトペンタンニトリルを下記一般式 (3) :



(式中、Mはアルカリ金属を表す) で表されるアルカリ金属塩として取得する3-ケトペンタンニトリルアルカリ金属塩の製造方法。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP02/10312

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>7</sup> C12P13/00// (C12P13/00, C12R1:01) (C12P13/00, C12R1:025) (C12P13/00, C12R1:05) (C12P13/00, C12R1:06) (C12P13/00, C12R1:15) (C12P13/00, C12R1:32) (C12P13/00, C12R1:37) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> C12P13/00-17/18, C07C255/11-255/14  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/WPI (DIALOG), CA/REGISTRY (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 94/21617 A1 (DOWELANCO), 29 September, 1994 (29.09.94), & AU 9465186 A	1-8
A	ITOH T. et al., Thiocrown Ether Technology in Lipase-Catalyzed Reaction: Scope and Limitation for Preparing Optically Active 3-Hydroxyalkanenitriles and Application to Insect Pheromone Synthesis. J. Org. Chem. Vol.62, No.26 (1997) pages 9165 to 9172	1-8
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 December, 2002 (27.12.02)		Date of mailing of the international search report 28 January, 2003 (28.01.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/10312

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
(International Patent Classification (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> (C12P13/00, C12R1:38) (C12P13/00, C12R1:465) (C12P13/00, C12R1:645) (C12P13/00, C12R1:65) (C12P13/00, C12R1:66) (C12P13/00, C12R1:72) (C12P13/00, C12R1:77) (C12P13/00, C12R1:785) (C12P13/00, C12R1:80) (C12P13/00, C12R1:84) (C12P13/00, C12R1:845)

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP02/10312

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims 1-9 include two inventions, i.e., an invention related to a process for producing optically active 3-hydroxypentanenitrile by making an enzyme capable of catalyzing asymmetric reduction act on 3-ketopentanenitrile as set forth in claims 1-8, and an invention related to a process for producing stable 3-ketopentanenitrile alkali metal salts as set forth in claim 9, and 3-ketopentanenitrile which is the main feature common to the two inventions is a publicly known compound. Further, both the inventions are not considered as having a special technical feature in common. Thus, the inventions are not considered as being so linked as to form a single general inventive concept.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-8

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP02/10312

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12P 13/00// (C12P 13/00, C12R 1:01) (C12P 13/00, C12R 1:025) (C12P 13/00, C12R 1:05) (C12P 13/00, C12R 1:06) (C12P 13/00, C12R 1:15)  
 (C12P 13/00, C12R 1:32) (C12P 13/00, C12R 1:37) (C12P 13/00, C12R 1:38) (C12P 13/00, C12R 1:465) (C12P 13/00, C12R 1:845) (C12P 13/00, C12R 1:85) (C12P 13/00,  
 C12R 1:86) (C12P 13/00, C12R 1:72) (C12P 13/00, C12R 1:77) (C12P 13/00, C12R 1:785) (C12P 13/00, C12R 1:80) (C12P 13/00, C12R 1:84) (C12P 13/00, C12R 1:845)

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12P 13/00-17/18, C07C 255/11-255/14

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/WPI (DIALOG), CA/REGISTRY (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 94/21617 A1 (DOWELANCO) 1994.09.29 & AU 9465186 A	1-8
A	ITOH T. et al. Thiacrown Ether Technology in Lipase-Catalyzed Reaction: Scope and Limitation for Preparing Optically Active 3-Hydroxyalkanenitriles and Application to Insect Pheromone Synthesis. J. Org. Chem. Vol. 62, No. 26 (1997) p. 9165-9172	1-8

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27.12.02

国際調査報告の発送日

28.01.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

4N

2937

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-9に記載された発明は、請求の範囲1-8に記載の3-ケトペンタンニトリルに不斉還元する酵素を作用させて光学活性3-ヒドロキシペンタンニトリルを製造する方法と、請求の範囲9に記載の安定化された3-ケトペンタンニトリルアルカリ金属塩の製造方法に係る、2の発明を包含し、しかもこの2の発明に共通する主要部である3-ケトペンタンニトリルは公知の化合物であり、さらに、両者は特別な技術的特徴を共有するものとはいえないので、これらの発明は、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1-8

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。